



Calciumphosphat-Nanopartikel als Basis für eine transfizierende Implantatbeschichtung

Dissertation

zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
vorgelegt von

Henning Urch
geboren in Wesel

Fachbereich Chemie
der
Universität Duisburg-Essen

Essen 2008

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 2005 bis Juni 2008 am Lehrstuhl für Anorganische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. Matthias Epple, an der Universität Duisburg-Essen in Essen durchgeführt.

- | | |
|---------------|----------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. M. Epple |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. R. Zellner |
| 3. Gutachter: | Prof. Dr. P. Behrens |

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2008

Inhalt:

Inhalt:	3
1 Einleitung	6
2 Theoretische Grundlagen	8
2.1 Kolloidchemie	8
2.1.1 Eigenschaften kolloidaler Systeme	9
2.1.2 Alterung und Koagulation von Dispersionskolloiden	11
2.1.3 Überlagerung der Wechselwirkungskräfte (DLVO-Theorie)	12
2.1.4 Stabilisierung von kolloidalen Dispersionen	14
2.2 Calcium und Calciumminerale	16
2.2.1 Calciumvorkommen in der Natur	16
2.2.2 Biologisches Hartgewebe: Knochen und Zähne	16
2.3 Biologische Hintergründe	18
2.3.1 Bewegung und Adhäsionsverhalten von Zellen auf Oberflächen	18
2.4 Techniken der Transfektion eukaryotischer Zelltypen	22
2.4.1 Retrovirale Vektoren	22
2.4.2 Adenovirale Vektoren	23
2.4.3 Adenoassoziierte virale Vektoren	23
2.4.4 Gene Gun	24
2.4.5 Polykation-vermittelte Transfektion.	24
2.4.6 Transfektion durch DNA beladene anorganische Nanopartikel	25
3 Ergebnisse und Diskussion	26
3.1 Synthesen der Calciumphosphat Nanopartikel	26
3.1.1 Einstufige Synthese	27
3.1.2 Zweistufige Synthese	28
3.1.3 Synthese im Rohrreaktor	30
3.2 Funktionalisierungen der Calciumphosphat-Nanopartikel	31
3.2.1 Funktionalisierung mit PSS	31
3.2.2 Funktionalisierung mit PAH	33
3.2.3 Funktionalisierung mit PVP	35
3.2.4 Funktionalisierung mit Polyethylenimin (PEI)	37
3.2.5 Zusammenfassung der Partikelsynthesen und Funktionalisierungs- experimente	41
3.3 Einfluss der Trocknungsmethoden auf die Kristallinität und das Agglomerationsverhalten	43
3.3.1 Ergebnisse der Trocknung an Luft nach Waschung mit Wasser	44
3.3.2 Ergebnisse der Trocknung an Luft nach Waschung mit 2-Propanol	46
3.3.3 Ergebnisse der Gefriertrocknung (Lyophilisation)	48
3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse von den verschiedenen Trocknungsmethoden	52
3.3.5 HRTEM Untersuchungen zur Aufklärung der internen Struktur und Zusammensetzung der Calciumphosphat-Nanopartikel	54
3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsmethoden	65
3.4 Elektrophoretische Beschichtungen von Oberflächen	69

3.4.1 Elektrophoretische Beschichtung von Plättchen aus Silicium und Titan mit funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln	71
3.4.2 Beschichtung von porösen Substraten aus Titan	74
3.4.3 Zusammenfassung der elektrophoretischen Beschichtungsversuche	79
3.5 2-D Laser-Patterning von beschichteten Substraten auf der Basis von Silicium und Titan	81
3.5.1 Laser-Patterning von beschichteten Siliciumwafern	83
3.5.2 Laser-Patterning von beschichteten Titansubstraten	86
3.6 Ausrichtung von Zellen auf laserstrukturierten Schichten	89
3.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse der Zellexperimente auf laserstrukturierten Templaten	90
3.6.2 Elektronenmikroskopische Ergebnisse der Zellexperimente auf laserstrukturierten Templaten	95
3.6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus licht- und elektronen-mikroskopischen Untersuchungen	100
3.7 DNA-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel als Basis für eine Implantatbeschichtung mit transfizierenden Eigenschaften	103
3.7.1 Beschichtung von Siliciumoberflächen mit DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln	105
3.7.2 Beschichtung von Titanoberflächen mit DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln	107
3.7.3 Beschichtung von Titan mit PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln als Akzeptoren für DNA zur Transfektion	114
3.7.4 Transfizierende Beschichtungen aus zweischaligen PEI/DNA Calciumphosphat-Nanopartikeln	117
3.7.5 Analyse der FACS-Daten	124
3.7.6 Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse	129
4 Materialien und Methoden	131
4.1 Synthese und Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel	131
4.1.1 Calciumphosphat-Nanopartikel	131
4.1.2 Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PAH	131
4.1.3 Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PSS	132
4.1.4 Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PVP	132
4.1.5 Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PEI	132
4.1.6 Synthese der zweischaligen Calciumphosphat/PEI/DNA-Nanopartikel	133
4.2 Methoden der Zellkultivierung und Transfektion	134
4.2.1 Kultivierung der sekundären Zelllinien	134
4.2.2 Kryokonservierung der Zellen	134
4.2.3 Transfektion von Oberflächen	135
4.2.4 Transfektion mit Polyfect zum Vergleich	135
4.3 Verwendete Methoden der Charakterisierung	136
4.3.1. Dynamische-Lichtstreuung zur Bestimmung der Größenverteilung	136
4.3.2. Dynamische-Lichtstreuung zur Bestimmung des Zetapotentials	139
4.3.3 REM (Raster-Elektronenmikroskopie)	140
4.3.4 TEM (Transmissions-Elektronenmikroskop)	144
4.3.5 EDX (Energiedispersive Röntgenspektroskopie)	144
4.3.6 Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)	145
4.3.7 Lyophilisation (Gefriertrocknung)	147
4.3.8 Thermogravimetrie	148
4.3.9 Durchfluß-Zytometrie (FACS)	149
4.3.10 Kritisch-Punkt-Trocknung (CPD: critical point drying)	150
4.3.11 Infrarot-Spektroskopie (IR)	151

5 Zusammenfassung	153
6 Literatur	155
7 Anhang	172
7.1 Abkürzungsverzeichnis	172
7.2 Gefahrstoffe und Entsorgung	174
7.3 Danksagungen	175
7.4 Lebenslauf	177
7.5 Erklärung	178

1 Einleitung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Entwicklung einer neuartigen Implantatbeschichtung mit „bioaktiven“ Eigenschaften. Dies bedeutet, dass die Eigenschaften der Beschichtung über das Maß der Biokompatibilität oder Biotoleranz hinausgehen sollte. „Passive“ Biomaterialien, wie Hydroxylapatit, werden nach einer Einbringung in den Organismus von den Zellen als nicht körperfremd eingestuft. Es erfolgt keine Abwehrreaktion und in der Regel ein Anwachsen von entsprechenden Zellen um das Implantat. Die Art des Anwachsens ist entscheidend für die Haltbarkeit des Produkts. Bildet sich eine fibrose Zellohülle um ein Implantat, so ist dieser Verbund lose und führt nach kurzer Zeit zu einem Versagen des Implantats [1, 2]. Wenn nun den Zellen direkt ein Signal vermittelt werden kann, was zum besseren Anwachsen führt (dies kann z. B. ein Knochenwachstumsfaktor sein), dann ist die Beschichtung „aktiv“ geworden.

Zu diesem Zweck sollten Nanopartikel aus Calciumphosphat verwendet werden, die mit Polymeren funktionalisiert wurden. Diese synthetischen Polymere dienten als Modell für ein Biopolymer, namentlich DNA. Auf diese Weise dargestellte Partikel sollten als nicht-virale DNA-Überträger dienen. Dieser Prozess, der nicht-viral vermittelten DNA-Übertragung wird als Transfektion bezeichnet. Erfolgreich transfizierte Zellen sollten dann das gewünschte Protein exprimieren; z. B. könnte es sich dabei um ein Zytokin handeln. Diese Methode könnte wesentlich erfolgreicher sein als zu versuchen, solche Proteine in die Matrix der Implantatbeschichtung einzubringen.

Das unter milden Bedingungen ablaufende physikalische Beschichtungsverfahren der elektrophoretischen Abscheidung bot sich für solche sensitiven Biopolymere an. Thermische Methoden würden unweigerlich die DNA zerstören. Um ein Substrat erfolgreich zu beschichten, sind extensive Kenntnisse über die dargestellten Nanopartikel an sich und die Synthese geeigneter Dispersionen nötig. Im Verlauf dieser Arbeit wurden umfangreiche Daten zu den Nanopartikeln gewonnen.

Verschiedenste Charakterisierungsmethoden wie Rasterelektronenmikroskopie (REM), hochauflösende Transmissionselektronenmikroskopie (HRTEM), Infrarot-Spektroskopie (IR), Röntgenbeugung (XRD), Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX), Thermogravimetrische Analyse (TGA) und

Dynamische Lichtstreuung (DLS) wurden angewandt, um die verschiedensten Ergebnisse zu den Kolloiden zu gewinnen. Neben den anorganisch-synthetischen Aspekten wurden materialwissenschaftliche Gesichtspunkte betrachtet, die biologischen Hintergründe von Zellen und DNA untersucht, um letztendlich nie den wichtigen Aspekt der medizinischen Anwendung aus dem Blick zu verlieren. Diese Arbeit behandelt somit ein fachübergreifendes Thema.

Am Institut für Anorganische Chemie an der Universität Duisburg-Essen wurden die Partikel synthetisiert und die Substrate beschichtet. In Kooperation mit dem Institut für Physikalische Chemie, ebenfalls an dieser Universität, wurden die Beschichtungen durch Laser strukturiert, um auf diesen Schichten die Ausrichtung von Zellen zu studieren, was eine Kooperation mit dem Institut für Physiologie am Universitätsklinikum Essen beinhaltet. Durch zwei DAAD-Projekte konnten zum einen an der Universität Lissabon thermodynamische Daten zu den Apatiten bestimmt werden und zum anderen an der Universität Madrid hochauflösende elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt werden, die viel zum Verständnis des Partikelbaus beigetragen haben. Die Zellexperimente zu den transfizierenden Schichten wurden in Kooperation mit zwei Arbeitskreisen an der Ruhr-Universität Bochum von Frau A. Kovtun durchgeführt.

2 Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel soll kurz eine Übersicht gegeben werden, in welchem theoretischen Rahmen diese Arbeit ausgeführt wurde. Wichtig sind hierbei Kenntnisse der Nanotechnologie, der Kolloidchemie, der Zellbiologie sowie der medizinischen Grundlagen. Nur unter Einbeziehung all dieser vielfältigen Wissensgebiete lassen sich die gewonnenen Resultate interpretieren.

2.1 Kolloidchemie

Eine kolloidale Dispersion ist eine Dispersion, in der Teilchen (Kolloide) in einem Dispersionsmittel sehr fein verteilt sind. Das Kolloid wie auch das Dispersionsmittel können in fester, flüssiger oder gasförmiger Form vorliegen (Tabelle 1). Die Größe der Kolloide liegt zwischen 1 nm bis 1 μ m. Die folgende Tabelle zeigt Beispiele für kolloidale Systeme und ihre Bezeichnung [3-7].

Beispiel	Typ	Disperse Phase	Dispersionsmittel
Nebel	Flüssige Aerosole	Flüssigkeit	Gas
Rauch	Festes Aerosol	Feststoff	Gas
Milch	Emulsion	Flüssigkeit	Flüssigkeit
Schaum	Schaum	Gas	Flüssigkeit
In Wasser dispergierter Hydroxylapatit	Dispersion	Hydroxylapatit (HAP)	Flüssigkeit

Tabelle 1: Beispiele für kolloidale Systeme

2.1.1 Eigenschaften kolloidaler Systeme

Die wichtigsten Eigenschaften kolloidaler Systeme lassen sich wie folgt beschreiben:

- Kleine Teilchen besitzen große spezifische Oberflächen
- Volumeneffekte konkurrieren mit Grenzflächeneffekten
- Adsorption von geladenen Molekülen auf deren Oberflächen
- Filmbildung in Lösungsmitteln
- Teilchenwechselwirkung

Die Herstellung von kolloidalen Systemen kann auf zwei Arten erfolgen:

1. Durch einen „Top-Down-Prozess“, bei dem ein Stoff durch immer feineres Zermahlen auf eine Größe gebracht wird, die im Bereich eines Kolloids liegt.
2. Durch einen „Bottom-Up-Prozess“, bei dem ausgehend von einer Synthese aus molekularen Teilchen die Kondensation zu einer größeren Phase im Bereich von wenigen Nanometern durch geeignete Hilfsmittel gestoppt wird. Dies kann bei einer Fällungsreaktion der Fall sein, wo durch Übersättigung ein Produkt in fester Phase ausfällt und durch Adsorption von Polymeren an den Kristallflächen ein weiteres Wachstum inhibiert wird [8-18].

Werden keramische Ausgangspulver in einem flüssigen Medium (Wasser, organische Lösungsmittel) dispergiert, so wirken auf die Kolloide folgende Wechselwirkungskräfte, die sich grundsätzlich in folgende Klassen einteilen lassen:

a. Anziehende van-der-Waals-Kräfte

Wechselwirkung zwischen fluktuierenden, elektrischen Dipolen

b. Abstoßende elektrostatische Kräfte

Die Teilchen in der Dispersion bilden eine elektrische Doppelschicht aus. Geladene Teilchen werden am kolloidalen Teilchen adsorbiert und bilden dort die teils starre, teils diffuse elektrostatische Doppelschicht rund um das

kugelförmige Teilchen aus. Auf diese Weise entsteht eine Ladungswolke, die sich symmetrisch um das kugelförmige Teilchen aufbaut. Diese positiven oder negativen Überschussladungen, die auf die spezielle Natur der Teilchen zurückzuführen sind, bewirken die abstoßenden Kräfte der Kolloide, wenn sich diese auf einen bestimmten Abstand in der Dispersion nähern.

Sie sind somit verantwortlich für die Stabilität einer Dispersion. Das sich ausbildende Potential wird als Zeta-Potential bezeichnet. Die verschiedenen Potentiale um ein geladenes Teilchen in Lösung sind in Abbildung 1 dargestellt.

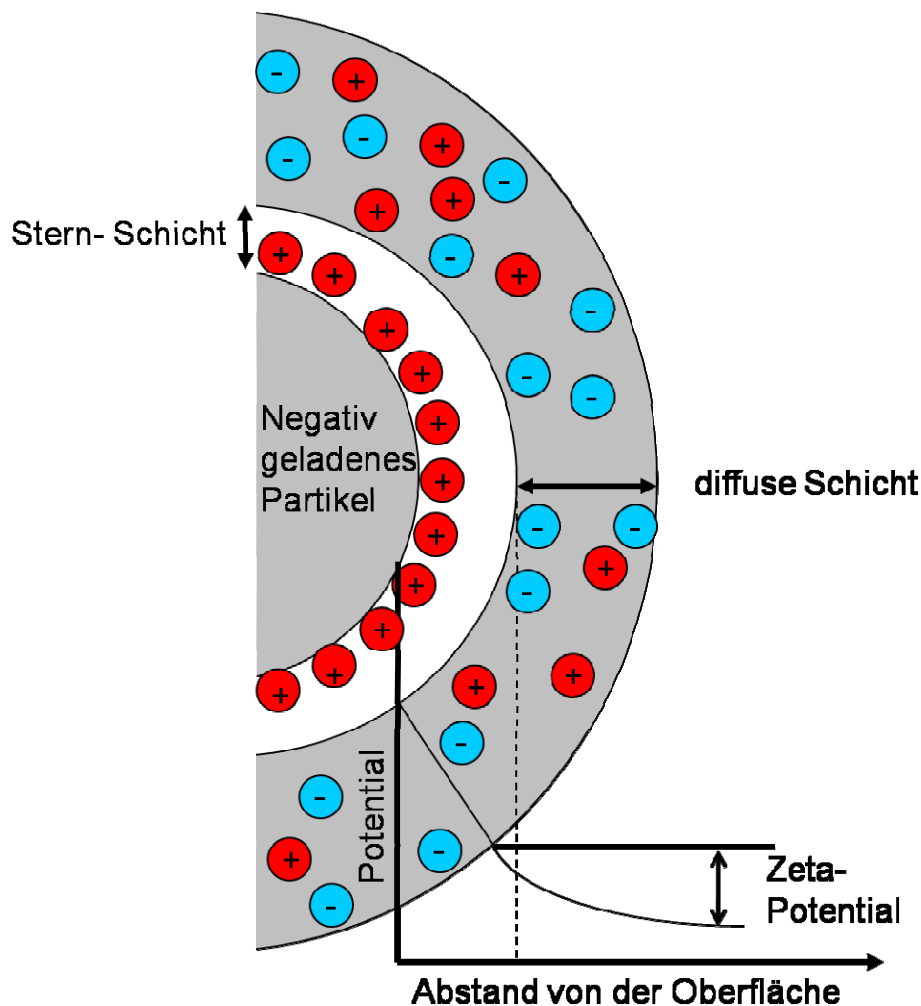


Abbildung 1: Schematische Darstellung der elektrischen Doppelschicht

2.1.2 Alterung und Koagulation von Dispersionskolloiden

Die Alterung von kolloidalen Systemen ist zugleich deren hervorstechendste und unerwünschteste Eigenschaft. Der „Alterungsprozess“ selbst ist das Bestreben der Dispersion, ihren thermodynamisch stabilen Zustand zu erreichen; eine Entmischung des Systems in eine feste und eine flüssige Phase. Die Löslichkeit jeder Substanz hängt auch von der Partikelgröße ab. Kleine Partikel haben eine höhere Löslichkeit als größere. Die geringste Löslichkeit besitzt die makroskopisch unendlich ausgedehnte Phase.

$$\frac{dm}{dt} = \frac{qDc_0}{\delta} \exp \left[\frac{\sigma_{sl}}{f(r_1)RT} \right] - \exp \left[\frac{\sigma_{sl}}{f(r_2)RT} \right] \quad \text{Gleichung 1}$$

Die Alterungsgeschwindigkeit dm/dt hängt im Wesentlichen von folgenden Faktoren ab:

- von der Löslichkeit der makroskopischen festen Phase c_0 ,
- von der Grenzflächenspannung σ_{sl} ,
- von den Radien r_1 und r_2 der kolloidalen Teilchen,
- vom Diffusionskoeffizienten D ,
- von der Temperatur T
- von der Viskosität δ

Dieser Gleichung zufolge dürften streng monodisperse, d. h. Teilchen mit einheitlicher Größe enthaltende, kolloidale Systeme nicht altern. Die Schwierigkeit besteht aber in der Herstellung monodisperser Systeme. Die Alterung kann durch Temperaturerhöhung beschleunigt werden, weil dabei Löslichkeit und Diffusionskoeffizient zunehmen. Die Alterung ist also der natürliche, spontan und langsam ablaufende Prozess des Zerfalls einer kolloidalen Dispersion. Am Ende dieses Vorgangs liegen eine entmischte feste Phase und das Dispersionsmittel vor.

Dieser Prozess kann beschleunigt werden, indem die Zusammensetzung des Dispersionsmittels beispielsweise durch Elektrolytzusätze verändert wird. In diesem Fall spricht man von der Elektrokoagulation. Diese Erscheinung gibt gleichzeitig Auskunft über den Ladungsaufbau der Kolloide und führt zur Theorie der Stabilität kolloidaler Systeme. Temperaturerhöhung fördert die Koagulation, da sie die Brownsche Molekularbewegung der Partikel verstärkt.

Im Verlaufe der Koagulation kommt es infolge einer Zusammenlagerung kolloidaler Partikel zu größeren Aggregaten bzw. Agglomeraten. Die Koagulation wird unter diesen Bedingungen auch als Agglomeration bezeichnet. In den Agglomeraten behalten die zusammengelagerten Teilchen zunächst ihre ursprüngliche Gestalt. In einem nachgeschalteten Prozess tritt dann Rekristallisation ein. Treten derartige Erscheinungen auf, so wird die Koagulation irreversibel und kann nicht durch die Redispersion rückgängig gemacht werden.

Der Endzustand des Koagulationsprozesses ist ein Koagulat, das meist die Struktur eines Gels besitzt, welches auch als Aggregationslyogel oder Aggregationsxerogel bezeichnet wird. Die Gelstruktur richtet sich nach dem Aufbau der kolloiden Teilchen und dem Solvatationszustand. Es wird zwischen reversibler und irreversibler Koagulation unterschieden.

2.1.3 Überlagerung der Wechselwirkungskräfte (DLVO-Theorie)

Die DLVO-Theorie (nach Derjaguin, Landau, Vervay und Overbeek [19]) besagt, dass die totale Wechselwirkungskraft F_t zwischen Teilchen in Suspensionen durch Überlagerung der Doppelschichtkräfte und der van der Waals-Kräfte erhalten wird:

$$F_t = F_d + F_{VDW} \quad \text{Gleichung 2}$$

Dies gilt ebenso für das totale Wechselwirkungspotential, welches man durch Überlagerung des abstoßenden Doppelschicht-Potentials und des anziehenden van-der-Waals-Potentials erhält:

$$W_t = W_d + W_{VDW} \quad \text{Gleichung 3}$$

Die Reichweite beträgt typischerweise zwischen 5 bis 100 nm. Sie hängt im Wesentlichen von der Doppelschichtdicke und damit von der Ionenstärke ab. Liegt ein ausgeprägtes primäres Maximum vor, so ist die Suspension stabil

gegen Koagulation [20]. Ein sekundäres Minimum im Potentialverlauf führt bei Suspensionen in der Regel zu einem teilkoagulierten Zustand mit erhöhter Viskosität und ausgeprägter Fließgrenze, da es die Teilchen vorziehen, in diesem Potentialtief zu verharren. Die Suspension koagulierte total, falls das Potential immer negativ bleibt und kein sekundäres Minimum vorliegt.

Die DLVO-Theorie entspricht für Teilchenabstände oberhalb 5 nm relativ gut der Realität.

Eine Darstellung der Potentialverläufe mit vorhandenen Minima und Maxima zeigt Abbildung 2.

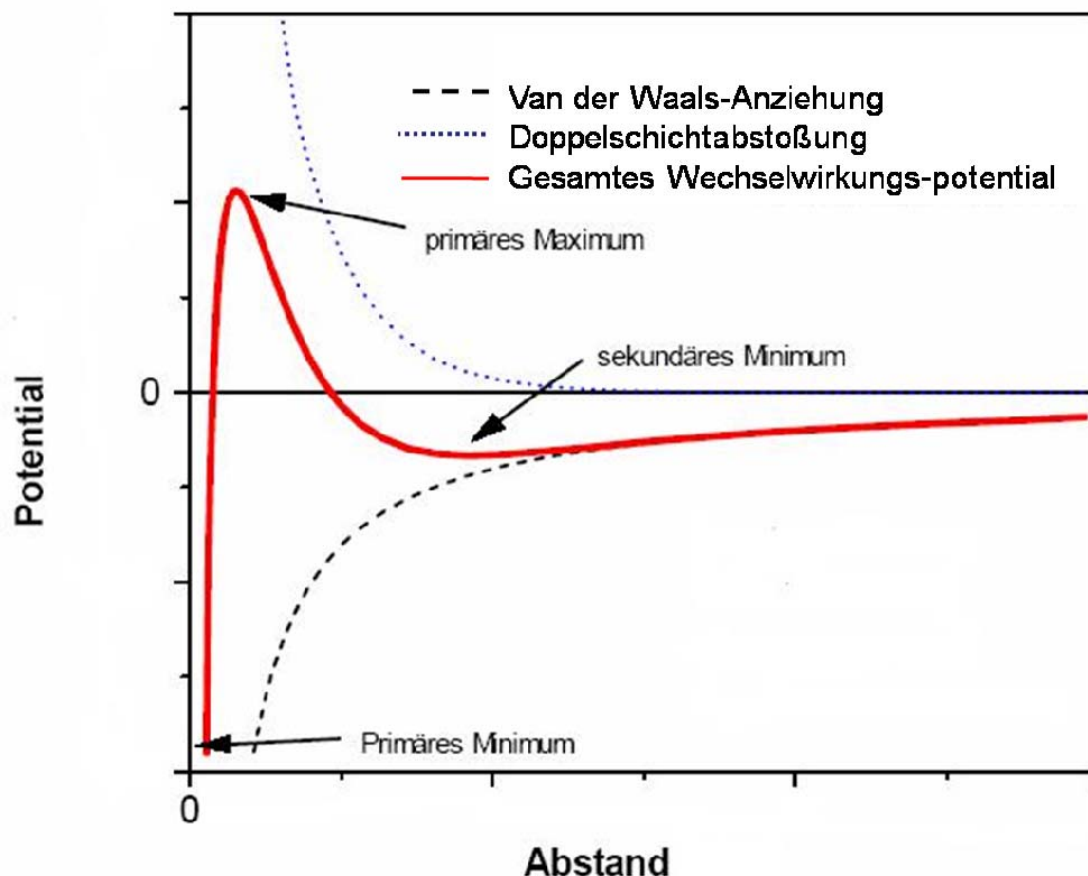


Abbildung 2: Potentialverlauf einer kolloidalen Dispersion in Abhängigkeit des Abstandes zweier Teilchen.

Darunter versagt sie, weil z. B. die endliche Größe der Ionen in der Doppelschicht nicht berücksichtigt wird. Die endliche Größe der meist noch hydratisierten Ionen kann eine zusätzliche sterische Abstoßung ergeben. Außerdem werden die Oberflächenladungen wie auch die Ladung der gelösten Ionen nicht als diskrete Größe behandelt. Kleine Ionenstärken führen zu großer

Reichweite und damit hoher Stabilität gegen Koagulation. Mittlere Ionenstärken führen zu einem ausgeprägten sekundären Minimum, aber nicht zur vollständigen Koagulation, da diese nur mit hoher Ionenstärke erzielt werden kann. Die Ionenstärke, bei der erstmals Koagulation eintritt, wird „critical coagulation concentration“ oder „ccc“ genannt.

2.1.4 Stabilisierung von kolloidalen Dispersionen

Die Schutzwirkung von Tensiden und makromolekularen Substanzen wurde durch Zsigmondy zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts durch die Goldzahl als diejenige Konzentration der stabilisierenden Substanz (in mg pro 10 cm³ Dispersion) definiert, welche den Umschlag eines hochroten Goldsols nach violett durch die Zugabe von 1 cm³ zehnprozentiger Kochsalzlösung verhindert [21]. Die stabilisierende Funktion der Zusätze ist sehr systemspezifisch. Unter anderem sind die Molmassen der schützenden Substanzen (Polymere) sehr unterschiedlich. Das wesentliche Ergebnis dieser Versuche besteht darin, dass insbesondere makromolekulare Schutzkolloide, welche grenzflächenaktiv sind und an den kolloidalen Teilchen adsorbiert werden können, Dispersionskolloide stabilisieren. Dies ist natürlich auch von großer praktischer Bedeutung. Es lag nun nahe, auch synthetische Hochpolymere, wie etwa Polyvinylalkohol, zur Stabilisierung einzusetzen. Dabei wurde das völlig überraschende Phänomen beobachtet, dass sowohl Stabilisierung als auch Micellbildung in Abhängigkeit von der Polymerkonzentration eintreten können. Die makromolekularen grenzflächenaktiven Verbindungen erwiesen sich den niedermolekularen Tensiden in ihrer stabilisierenden Wirkung überlegen.

Will man die Schutzwirkung von Polymeren im Fall der Dispersionskolloide erklären, so spricht man von sterischer Stabilisierung oder sterischer Hinderung. Bei der Dispersionsstabilisierung durch niedermolekulare Tenside kann die sterische Wechselwirkung in folgende Teilprozesse aufgegliedert werden: gegenseitige Durchdringung der beiden Adsorptionsschichten, Stauchung der Moleküle in den Adsorptionsschichten, tangentielle „Kompression“ der Tensidmoleküle zwischen den beiden Adsorptionsschichten der kolloidalen Partikel und Desorption der Schichten. Geht die stabilisierende Wirkung von adsorbierten Polymerschichten aus, so reduziert sich dies auf die Durchdringung

der Polymerschichten und die Stauchung in den Schichten (Abbildung 3). Ein Argument dafür ist, dass die Adsorption in vielen Fällen irreversibel verläuft. Aufgrund des erforderlichen großen Platzbedarfs der Polymermoleküle und der Tatsache, dass mehrere Segmente eines Moleküls adsorbiert sind, ist das Auftreten der tangentialen Kompression wie im Fall der niedermolekularen Tenside unwahrscheinlich.

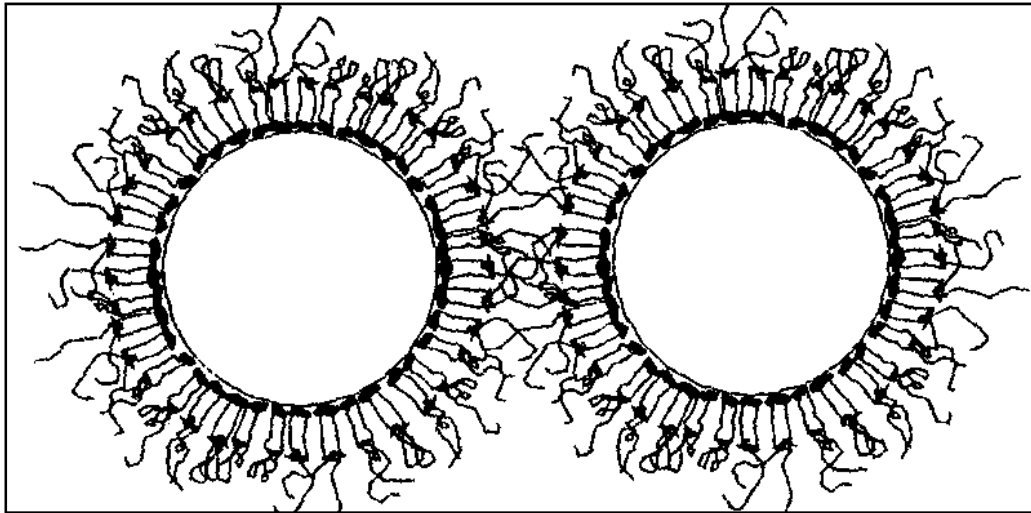


Abbildung 3: Kolloide mit polymeren Liganden [19].

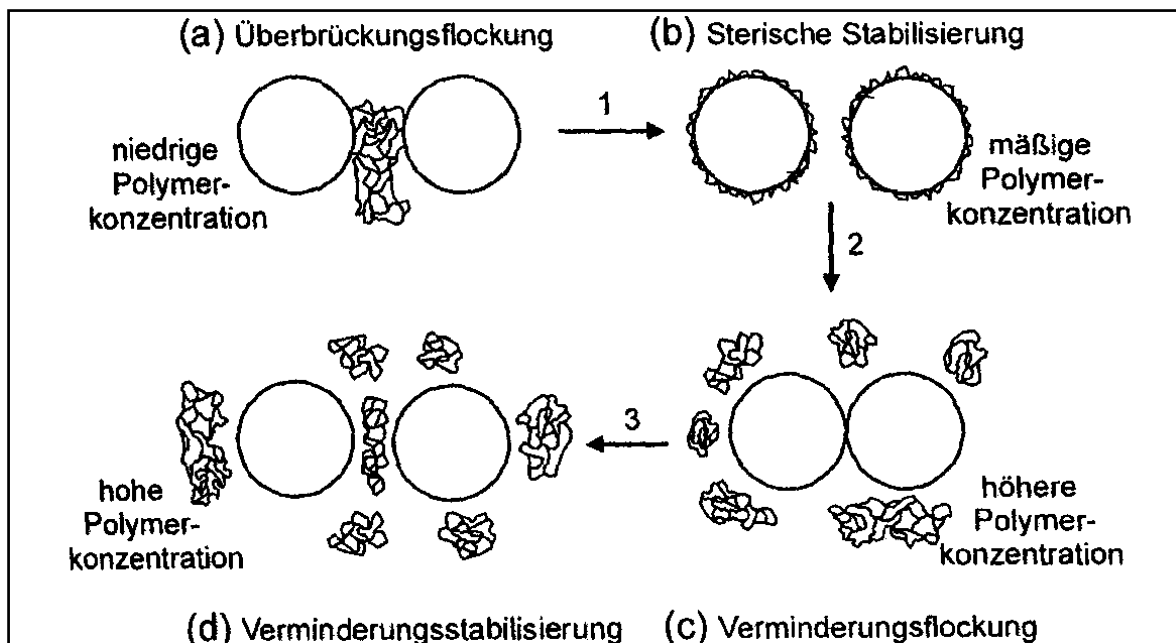


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Polymerflockung in einer Dispersion kolloidaler Teilchen [19].

In Abbildung 4 ist die Flockung bei unterschiedlichen Polymer-Konzentrationen dargestellt. Eine Stabilisierung der Kolloide tritt bei einer bestimmten Konzentration an Polymer auf. Zu viel oder zu wenig Polymer begünstigen eher die Flockung und Entmischung des Systems [19].

2.2 Calcium und Calciumminerale

In diesem Kapitel soll eine kurze Einführung in das Element Calcium und seine Verwendung von Lebewesen als Mineral gegeben werden.

2.2.1 Calciumvorkommen in der Natur

Das Vorkommen von Calcium in der unbelebten Natur findet sich in mineralischen Vorkommen hauptsächlich als CaCO_3 (Kalkstein, Marmor), CaSO_4 (Gips) und als Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$). Die Lagerstätten von Kalkstein stammen aus den Perioden des Erdalters vom Devon bis zur Kreide; hierbei handelt es sich um Ablagerungen mariner Lebensformen. Dies zeigt die hohe Bedeutung des Calciums als biogenes Material und seine Verwendung von biologischen Lebewesen seit Urzeiten [22-27]. Insgesamt ist Calcium das fünfthäufigste Element der Erdkruste [28].

2.2.2 Biologisches Hartgewebe: Knochen und Zähne

Die Knochen und Zähne von Wirbeltieren sind natürliche Kompositmaterialien, bei denen die eine Komponente die anorganische Festphase ist (nanokristalliner Carbonat-Apatit) und die andere eine biologische Matrix aus Kollagen [29-33]. Der anorganische Anteil an der Gesamtmasse beträgt, je nach Knochentyp, zwischen 25 % und 90 %. Die poröse innere Spongiosa des Knochens enthält einen geringeren Anteil an Apatit, während die äußere, harte Schicht einen höheren Anteil aufweist. Die mineralische Phase im sehr harten Enamel beträgt bis zu 99 %. Beim Rest handelt es sich um die organische Matrix und Wasser [29]. Die Knochen aller Wirbeltiere können als „lebende Biomaterialien“ bezeichnet werden, da in ihrem Inneren ein ständiger Prozess des Auf- und Abbaus abläuft, der von verschiedenen Zelltypen gesteuert wird.

Den Aufbau des Knochenmaterials übernehmen die Osteoblasten. Ihr Verhalten im Knochen oder auch auf synthetischen Materialien wird in der Literatur vielfach beschrieben [34-37]. Der Prozess des „Knochen-Remodeling“ startet mit der Aktion dieses Zelltyps. Die Osteoblasten produzieren eine Proteinmatrix, hauptsächlich Kollagen Typ I, die dann in der Folge mineralisiert wird. Der Osteoblast verbleibt meist in dieser Matrix und wandelt sich um in einen Osteocyten [38]. Im Wechselspiel mit diesem Zelltyp stehen die Osteoclasten [39, 40]. Sie sind für den Abbau von Knochenmaterial zuständig. Dieser dynamische Prozess von Auf- und Abbau macht Knochen zu einem ständig im Wandel begriffenen, lebenden Material, was nicht nur zur Stabilität eines Organismus beiträgt, sondern gleichzeitig noch wichtige andere Funktionen, wie z. B. Calcium- und Phosphatspeicherung, erfüllt. Zähne sind ähnlich aufgebaut wie Knochenmaterial, mit Ausnahme ihres harten Zahnschmelzes (Enamel) der bis zu 99 % Apatit enthält. Es ist eines der härtesten Biomaterialien auf der Welt. Härter wäre z. B. der Fluorapatit in Haifischzähnen und Eisenoxid aus Magnetosomen [41, 42]. Da das Enamel keine Zellen enthält, wird es bei Beschädigung nicht wieder aufgebaut. Verlorener Zahnschmelz wird in der Zahnmedizin mit Amalgam, Polymeren oder synthetischen Keramiken substituiert [43-45]. Dies erklärt den großen Markt für geeignete Füllmaterialien in der Dentalmedizin.

2.3 Biologische Hintergründe

Um Aussagen über die biologische Verträglichkeit eines Materials zu treffen, ist es unabdingbar, über Zellexperimente das Verhalten von Zellen auf diesem Material zu untersuchen. Natürlich verhalten sich verschiedene Zellarten auch anders. Ein Implantat im Knochen kommt auch mit anderen Zellen in Kontakt als z. B. ein Stent im Koronargefäß. Somit sind an dieses Material auch andere Anforderungen gestellt. Die in dieser Arbeit entwickelte Beschichtung wird in ihrer Anwendung hauptsächlich mit adhärierenden Zellen, wie Osteoblasten und Fibroblasten, zu tun haben. Somit ergab es Sinn, eine adhärierende Zelllinie wie NiH3T3 (Maus, embryonale Zelllinie) zu wählen. Diese wird als Zelllinie gerne für Transfektionsversuche genutzt. Hierzu sind Kenntnisse des Adhäsionsverhaltens von Zellen im allgemeinen erforderlich, die Vitalitätszeichen der Zelle zu deuten, sowie ein Wissen über Vor- und Nachteile der verschiedenen Wege, um eukaryotische Zellen mit einem gewünschten Gen zu transfizieren.

2.3.1 Bewegung und Adhäsionsverhalten von Zellen auf Oberflächen

Die Beweglichkeit von Zellen stellt eine der bedeutendsten Errungenschaften der Evolution dar. Waren die ersten Zellen noch unbeweglich und ließen sich passiv von der Strömung der sie umgebenden „Ursuppe“ treiben, so kam es in den ersten primitiven mehrzelligen Lebewesen schon zu Wanderungen von differenzierten Zellen zu unterschiedlichen Teilen des Organismus. In heutigen adulten Lebewesen ist die Beweglichkeit von Zellen der Immunabwehr eine gerichtete und unabdingbare Voraussetzung zur erfolgreichen Immunantwort. Sind die meisten Zellen im Organismus zwar fest an einen Ort gebunden, so sind sie dennoch zu erstaunlichen Bewegungsabläufen in der Lage, wie z. B. zur Kontraktion von Muskelzellen. Äußerst kompliziert erscheinen dazu Bewegungsabläufe, wie die Einschnürung einer Zelle bei der Mitose, die Trennung der Chromosomen und die Strömung des Zytosols. Hierbei läuft keine Bewegung der Zelle weder zufällig noch ungerichtet ab. Die Bewegung einer Zelle wird durch koordinierte Bewegungen des aus Actin-Proteinen bestehenden Zytoskeletts ausgeführt. Über eine Fluoreszenzfärbung des Actins lassen sich die Actinfasern einer Zelle sichtbar machen. Das Actin selbst ist ein

Protein aus etwa 375 Aminosäuren und ist in einer Zelle so reichlich vorhanden, dass es solche Raum füllenden Strukturen ausbilden kann.

Die Zellverbindungen, die ein Anhaften der Zelle an einem Substrat ermöglichen, werden als fokale Adhäsionen (engl. *focal adhesions*) bezeichnet. Diese verankernden Zellverbindungen binden das Actin-Zytoskelett der Zelle an eine extrazelluläre Matrix, wie z.B. an ein Implantat. Bis zu 50 Proteine spielen dabei eine Rolle [46]. An der Spitze der von der Zelle gebildeten Filopodien haften diese Proteine an dem Substrat (Abbildung 6). Ihre Ausbildung ist entscheidend für das Anhaften der Zelle. Je nach Art und Menge der Filopodien und Lamellopodien lassen sich Aussagen zur Verträglichkeit des Materials treffen [35, 47-51]. Tote Zellen lassen sich gut an ihrer kugeligen Gestalt erkennen, die im weiteren Stadium der Apoptose runde Vesikel an ihrer Oberfläche ausstülpen (Abbildung 5).

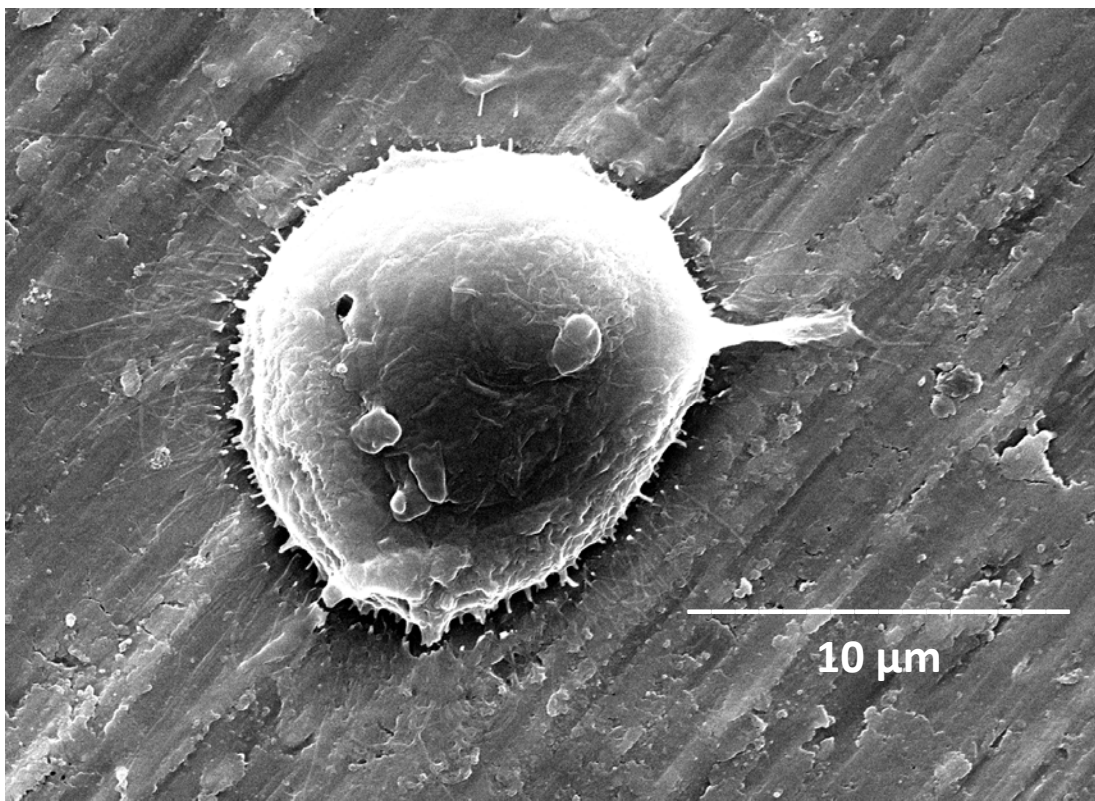


Abbildung 5: Fibroblast auf einer Titanoberfläche im Zustand der Apoptose.

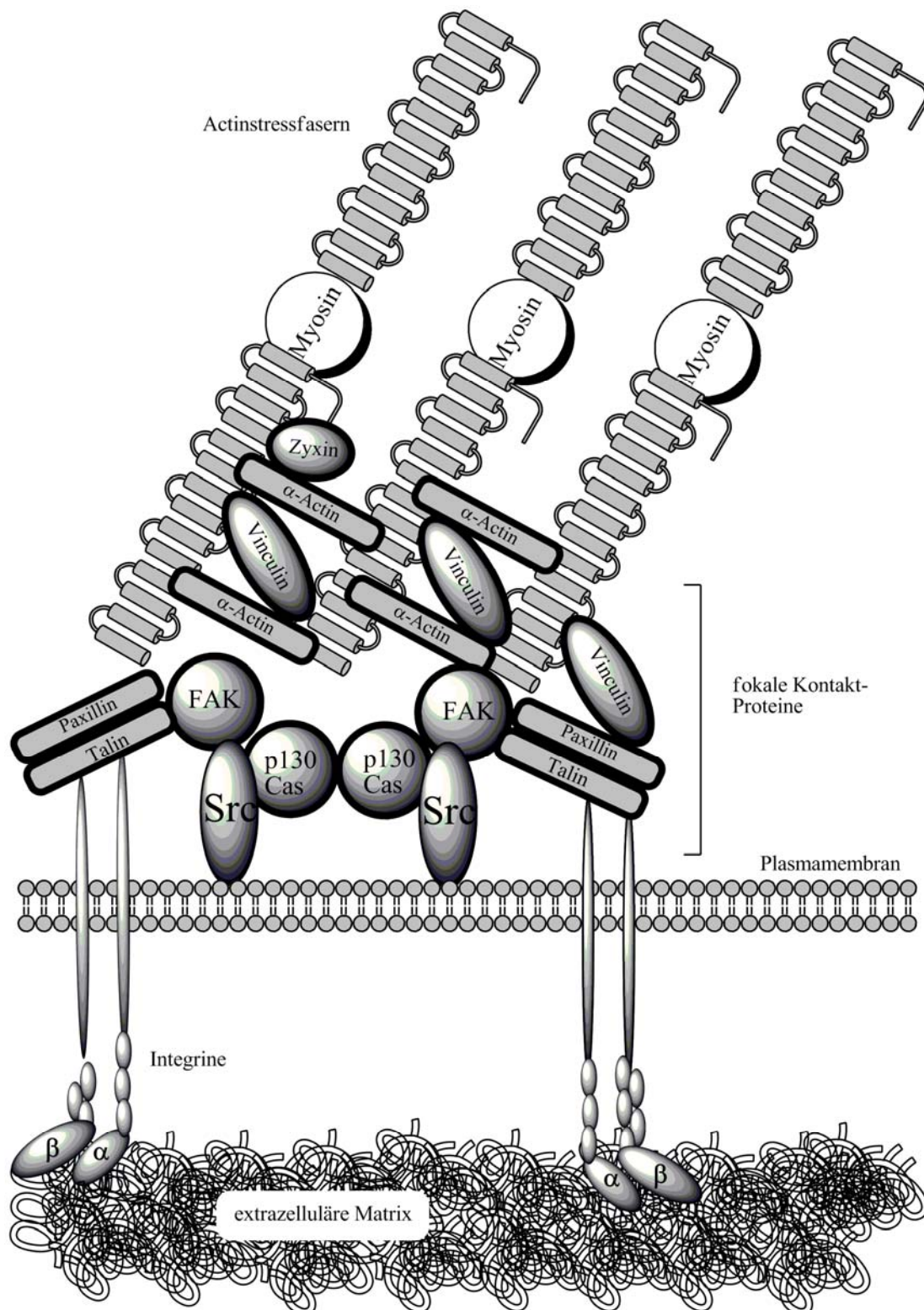


Abbildung 6: Über die fokalen Adhäsionskontakte wird das Zytoskelett der Zelle an eine extrazelluläre Matrix gekoppelt. Die Proteine Paxillin und Talin binden die Integrine nach Expression der fokalen Adhäsionskinase (FAK) und Vinculin. Das α -Actin wiederum ist ein Protein des Zytoskeletts, das durch FAK phosphoryliert wird und dann ans Vinculin gebunden wird, um die Actinstressfasern der Zelle zu konnektieren. Zyxin ist ein Actin-Protein welches ebenfalls die Stressfasern bindet und nur in länger bestehenden Kontaktpunkten zu finden ist (nach Mitra et Al. [52]).

Betrachtet man auf elektronenmikroskopischen Bildern sich bewegende Zellen auf einer Oberfläche, so lassen sich nach einiger Interpretation der Zellmorphologie Aussagen zur Bewegungsrichtung der Zelle treffen. Die REM-Aufnahme eines Fibroblasten in Abbildung 7 zeigt den anhaftenden Fuß der Zelle, die Filopodien, die den Zellkörper verankern, sowie lamellare Ausstülpungen. Die obere Ausstülpung in etwa 20° Richtung gibt die Bewegungsrichtung der Zelle vor. Nachdem die Ausstülpung über fokale Adhäsionsplaques ([53-56]) am Untergrund fixiert wurde, strömt das Cytosol in die Ausstülpung und bewegt so den Zellkörper vorwärts. Die Reste der Adhäsionsplaques mit den fokalen Adhäsionen können abreißen und mit einem kleinen Zellrest an der Oberfläche verbleiben. Dies ist nicht schädlich, sondern ein ganz normaler Vorgang während der Zellbewegung.

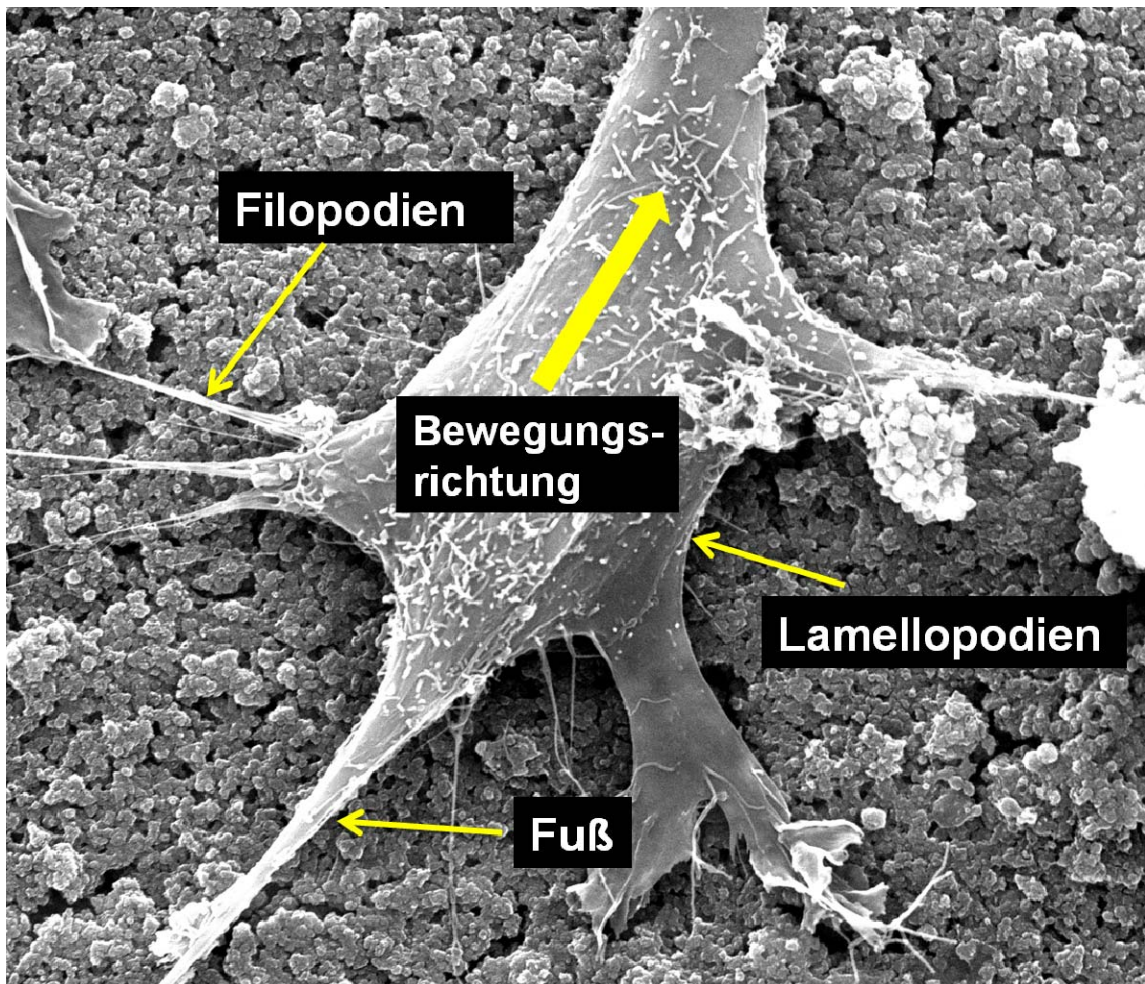


Abbildung 7: REM-Aufnahme eines Fibroblasten mit seinen fokalen Adhäsionen. Die Bewegungsrichtung führt entlang der dicksten Ausstülpung. Reste der fokalen Adhäsionskomplexe am Fuß verbleiben nach der Ablösung auf der Oberfläche.

2.4 Techniken der Transfektion eukaryotischer Zelltypen

Als Transfektion bezeichnet man die nicht-virale Einbringung von fremder DNA in eine eukaryotische Zelle. Die virale Einbringung wird im Gegensatz dazu als Transduktion bezeichnet [57-61]. Für die Transduktion stehen Retroviren [62-65], Adenoviren [66-68] und Adenoassoziierte Viren [57, 69-79] zur Verfügung. Nicht-virale Vektoren sind Liposome [80-84], nichtliposomale Lipide [85], Polykationen [86-90] und Nanopartikel [91-96]. Für eine erfolgreiche Transfektion ist es erforderlich, extrazelluläre Moleküle wie plasmidische DNA durch die Plasmamembran der Zelle zu bringen und anschließend den weiteren Weg durch das Zytoplasma bis hin zum Zellkern. Hier erfolgt die Transkription des Gens mit der Expression des gewünschten Proteins. Die nicht-viralen Vektoren besitzen eine niedrige Zytotoxizität und sind nicht immunogen; leiden aber an einer niedrigen Transfektionseffizienz [95, 97-104]. Bei den Polykationen spielt PEI mit 25 kDa oder auch 800 kDa eine wichtige Rolle. Die Effizienz dieses Verfahrens ist hoch; dazu auch die Zytotoxizität. Varga et al. berichteten über die Effizienz von adenoviralen Vektoren im Vergleich zu verschiedenen PEI-Vektoren [68]. Selbst mit einigen chemischen Verbesserungen lag die Effizienz des PEI-Vektors um eine Zehnerpotenz unter der des viralen [68]. Dennoch geht der Trend in der Forschung zu den nichtviralen Vektoren. Die Gefahr der Immunogenität der viralen Systeme ist ein unabwägbares Risiko. Im Folgenden sollen einige der chemischen, physikalischen und viralen Methoden der Gentherapie kurz erläutert werden.

2.4.1 Retrovirale Vektoren

Ein retroviraler Vektor basiert auf RNA-Viren. Diese bestehen aus einem Einzelstrang an RNA, umgeben von der Virushülle aus Lipid. Bekannte Vertreter dieser Spezies sind Hepatitis-C, Röteln und Coronaviren (1/3 aller Erkältungen basieren auf Coronaviren). Die DNA wird nach der erfolgreichen Transduktion im Genom der Zelle eingebaut und transkribiert. Hieraus ergibt sich eine sehr langandauernde Expression des Proteins. Die verwendeten Viren werden vorher dahingehend verändert, dass sie sich nicht mehr vermehren können. Diese in ihrer Replikation inhibierten Viren können aber nur Zellen

transduzieren, die sich in Teilung befinden. Um ruhende Zellen eines Organismus zu transduzieren, müssen diese Zellen vorher in das Stadium der Teilung versetzt werden. Dies geschieht am einfachsten außerhalb des Körpers. Ein solcher ex-vivo Ansatz wurde bereits erfolgreich in einer Studie getestet [105].

2.4.2 Adenovirale Vektoren

Die Familie der Adenoviren ist bekannt für ihre harmlos verlaufenden Erkrankungen des Respirationstrakts. Adenoviren sind hüllenlose Viren mit einer doppelsträngigen DNA im Inneren eines ikosaedrischen Kapsids. Da die virale Replikation ohne eine Integration in das Zielgenom stattfindet, ist die Expression des kodierten Proteins auch transient. Dennoch liegt der Vorteil der Adenoviren in ihrer hohen Effizienz und der Möglichkeit, auch nicht in Teilung befindliche Zellen zu transduzieren. Der gravierende Nachteil liegt in der Immunogenität der Vektoren. Nach der viralen „Erstinfektion“ erfolgt die Immunantwort des Organismus mit dem Ziel, alle infizierten Zellen zu vernichten. Eine zweite Gabe des Vektors kann eine äußerst heftige Immunantwort auslösen. Der Einsatz von adenoviralen Vektoren ist nach dem Tod von Jesse Gelsinger bei einer Gentherapie im Jahre 1999 praktisch zum Erliegen gekommen [106, 107].

2.4.3 Adenoassoziierte virale Vektoren

Adenoassoziierte Viren kommen praktisch in jedem humanen Organismus vor. Sie benötigen zur Replikation die Hilfe eines Adenovirus. Daher vermutlich die Bezeichnung Dependoviren. Sie sind ein in der Literatur diskutierter vielversprechender Ansatz, weil sie mit keiner Krankheit beim Menschen in Verbindung gebracht werden können [108, 109]. Ihre Transduktionseffizienz ist gleichwohl sehr hoch. Der gravierendste Nachteil dieses Vektors ist jedoch seine geringe Größe. Die maximale kodierbare Information im Virus beträgt 4,7 Kbyte [77].

2.4.4 Gene Gun

Die physikalische Methode der „*Gene Gun*“ beruht auf der Beladung von Gold oder Wolfram-Nanopartikeln mit DNA. Diese Partikel werden dann auf die zu transfizierenden Zellen geschossen. Diese Methode stellt den bislang verwendeten Stand der Technik dar, um transgene Pflanzen herzustellen. Keine andere Methode ist dazu in der Lage, die dicke und solide Zellwand pflanzlicher Zellen zu penetrieren [110]. Der Beschuss mit kinetisch beschleunigten Teilchen führt jedoch zu einer hohen Zahl an zerstörten Zellen. Ihr Einsatz im humanen Bereich wird in der Literatur diskutiert, besitzt aber aufgrund derselben Probleme eine geringe Anwendungsbreite [111]. Ein Einsatz wird wohl nur bei Zellen ex-vivo möglich sein, da die meisten Zellen das Verfahren nicht überleben. Solch ein Verfahren für Bauchspeicheldrüsen-Zellen wurde von Gafal et al. beschrieben [112].

2.4.5 Polykation-vermittelte Transfektion.

Polykationen können mit der polyanionischen DNA wechselwirken und zu kompakten Partikeln von 20-200 nm aggregieren [68, 81, 87, 99, 102, 113-115]. Diese Kondensation ist reversibel, die Aggregate können im Endosom aufgelöst werden. Die Fähigkeit der Polykationen, die DNA überhaupt in nanopartikuläre Formen zu kondensieren, ist der entscheidende Schritt für die Transfektionseffizienz [98, 101, 116-118]. Je kleiner das Aggregat, desto höher die Transfektionseffizienz. Die Einführung von PEI als Polykation wurde erstmals 1995 von Boussif et al. beschrieben [119]. Es hat sich als das Polykation mit der höchsten Effizienz erwiesen [120-122]. Sein Nachteil liegt in der Zytotoxizität [87, 88, 123]. Solche Aggregate sind trotz der DNA noch positiv geladen. Beim Eintritt in einen Organismus aggregieren solche Vektoren aufgrund der reichlich im Plasma vorhandenen negativ geladenen Proteine. Gelangen die Vektoren auf eine Zelle, so werden sie dort über Endozytose aufgenommen. Werden sie nicht vollständig im Endosom abgebaut, so können sie zum Zellkern gelangen und dort die inkorporierte DNA entlassen [92]. Der kritischste Schritt ist nicht die Aufnahme in die Zelle, sondern die Verhinderung der Degradation der DNA im Zytoplasma und im Endosom. Der Abbauprozess im Zytoplasma ist gegenwärtig noch unzureichend erforscht, ein genaues Modell dieses Prozesses existiert nicht [120, 124, 125].

2.4.6 Transfektion durch DNA beladene anorganische Nanopartikel

Die Tatsache, dass Zellen dazu in der Lage sind, Nanopartikel aufzunehmen, ist weit bekannt [95, 126-130] und in der gegenwärtigen Lage auch zum Teil befürchtet [131, 132]. Inwieweit die heutige industrielle Verwendung von Nanopartikeln in Dingen des alltäglichen Gebrauchs eine gesundheitliche Gefährdung darstellt, werden Forschungen in der Zukunft zeigen. Dennoch werden zur Transfektion Nanopartikel aus Siliciumdioxid [130], Eisenoxid [133], Gold [134], und vor allem Calciumphosphat [101, 103, 135, 136] eingesetzt. Die Überlegung zur Verwendung von Calciumphosphat als Vektor basiert auf der Tatsache, dass das Nanopartikel beim Abbau in der Zelle keine toxischen Substanzen entlässt. Die Verwendung von toxischen Metallen verbietet sich von selbst. Calcium kann in höheren Dosen für eine Zelle toxisch sein, aufgrund der ubiquitären Präsenz von Calcium im Organismus hat jedoch jede Zelle Ionenpumpen in der Membran, die einen hohen Calciumgehalt ausgleichen können [137, 138]. Sofern nicht zu viele Nanopartikel von der Zelle aufgenommen werden, kann dieser natürliche Prozess eine toxische Wirkung verhindern.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Synthesen der Calciumphosphat Nanopartikel

Die Basis für reproduzierbare Synthese-Ergebnisse ist eine strenge Kontrolle der Syntheseparameter. Der anfälligste Parameter ist hierbei die Art der Synthese. In einem kontinuierlichen Prozess lassen sich viele Faktoren eines „Batch-Prozesses“ vermeiden, die für eine Störung im Ergebnis sorgen [139]. Eine kontinuierliche Synthese von Nanopartikeln aus Calciumphosphat, bevorzugt Hydroxylapatit als eine Phase des Calciumphosphat wurde bereits 2001 im Arbeitskreis Epple entwickelt [139, 140]. Der konstante Betrieb unter Einhaltung der Syntheseparameter wie Konzentration der Lösungen, pH-Wert, Reaktorvolumen und Verweilzeit ermöglichte die reproduzierbare Synthese eines nanokristallinen Apatits. Das Material wurde unter anderem kalt-isostatisch gepresst, um Formkörper als Knochenersatzmaterial zu erhalten [141]. Die Formkörper erwiesen sich als mechanisch belastbar und biokompatibel. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Synthesemöglichkeiten weitergehend dahin untersucht werden, inwieweit sich die Kolloide mit verschiedenen Polymeren funktionalisieren lassen. Die Möglichkeit der Funktionalisierung mit Tensiden und einigen Polymeren konnte bereits im Rahmen einiger Arbeiten untersucht werden [142-144]. Um weitere Daten zur Charakterisierung der Partikel an sich zu gewinnen, wurden verschiedene Variationen an der Synthese vorgenommen und vielfältige Wege zur Charakterisierung der Nanopartikel gewählt.

3.1.1 Einstufige Synthese

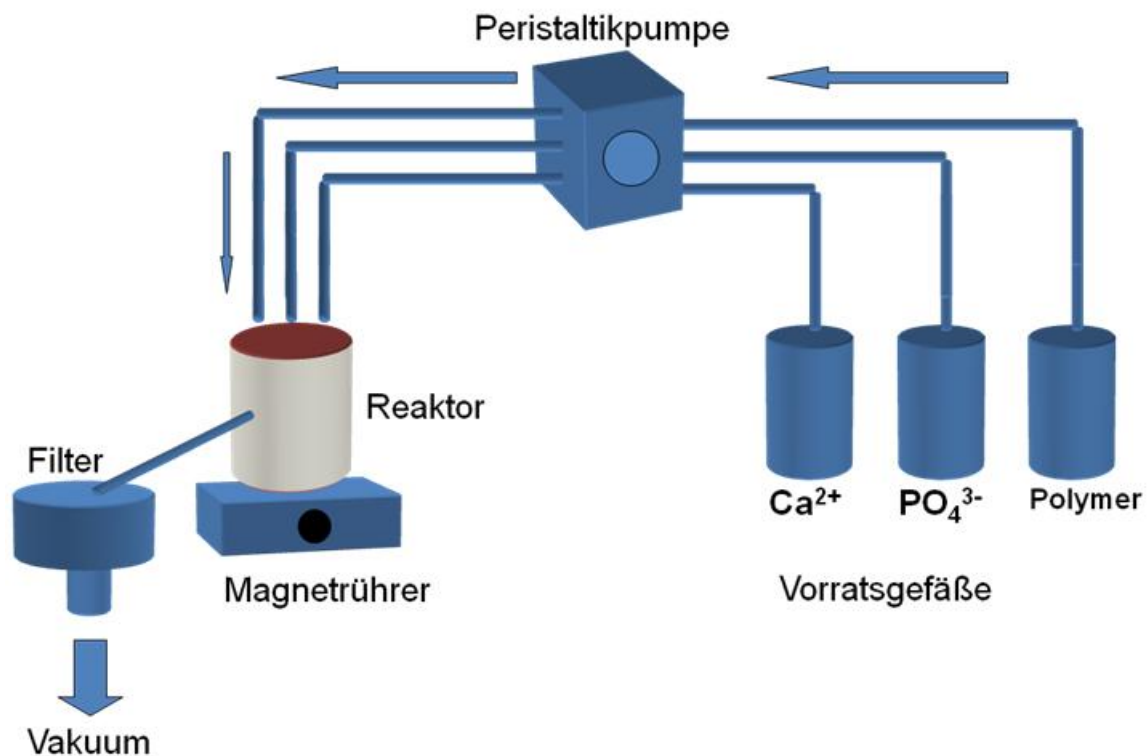


Abbildung 8: Schematische Darstellung der einstufigen Synthese.

Die einstufige Synthese (Abbildung 8), bei der die Fällung und Funktionalisierung der Partikel in einem Reaktor geschah, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt [144]. Das Verfahren wies jedoch gravierende Mängel auf, vor allem im Hinblick auf die Stöchiometrie der Partikelzusammensetzung. Aufgrund der „Ein-Topf-Synthese“ konnte nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Fällung auch Polymer in das Partikel selbst eingeschlossen wird. Ohne die Kenntnis von kinetischen Daten zur Reaktion ist es nicht möglich zu sagen, dass zuerst die Präzipitation der Partikel erfolgt und anschließend die angenommene langsamere Funktionalisierung mit dem Polymer.

Die Bestimmung der Morphologie der Partikel konnte im REM durchgeführt werden. Die durchschnittliche Größe der Partikel lag bei ca. 50-80 nm. Es ist aber auf den Aufnahmen gut zu sehen (Abbildung 9), dass viele der Partikel als Agglomerate vorliegen.

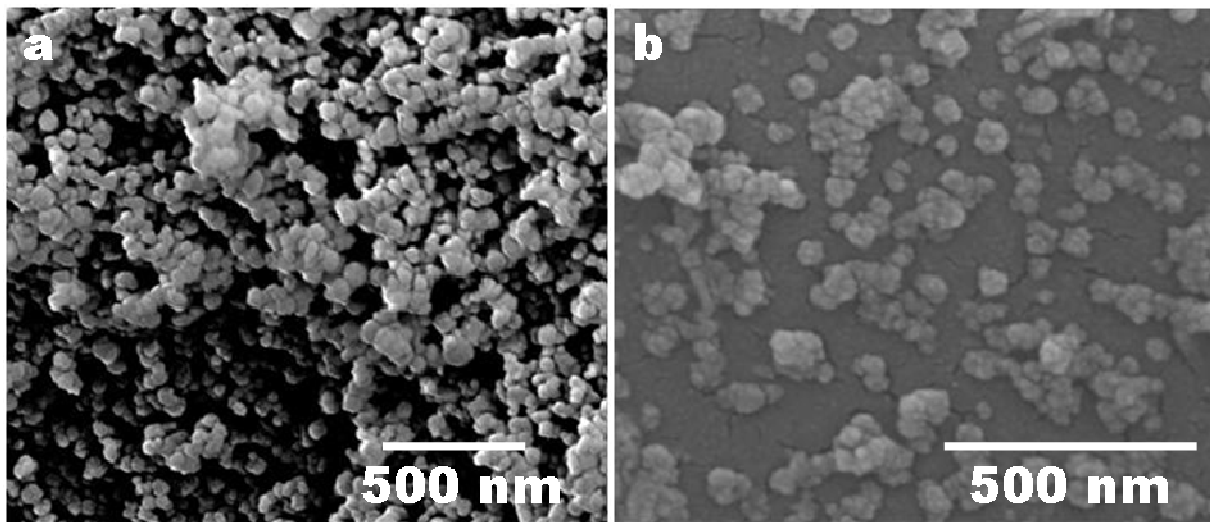


Abbildung 9: REM-Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln aus der einstufigen Synthese, funktionalisiert mit den Polymeren Polyvinylpyrrolidon (PVP, a) und Polystyrolsulfonsäure (PSS, b) [144].

3.1.2. Zweistufige Synthese

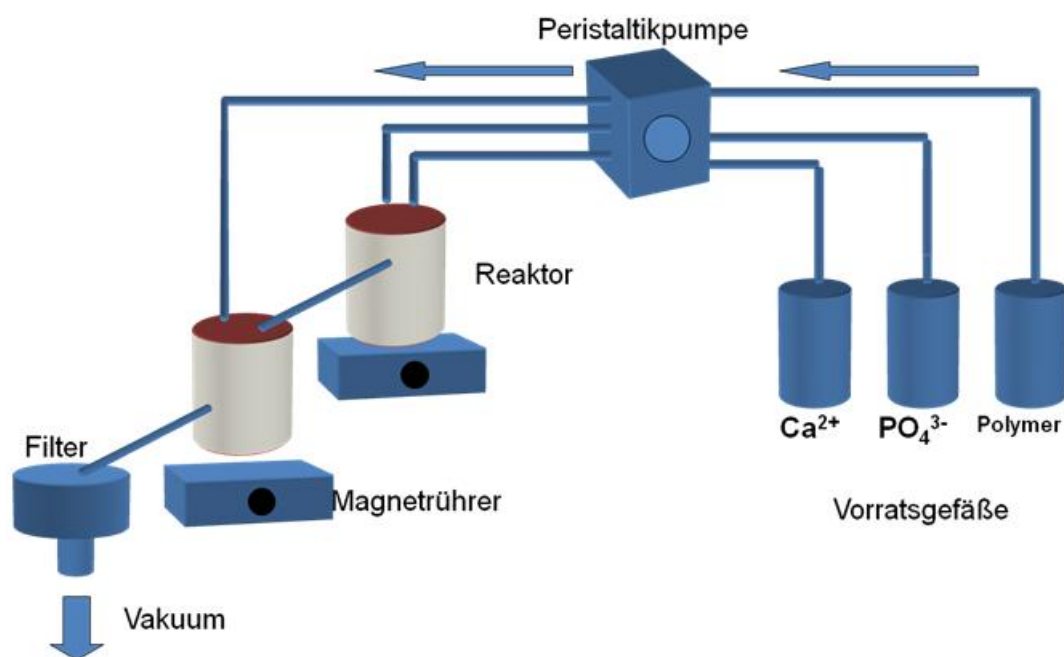


Abbildung 10: Schematische Darstellung der zweistufigen Synthese.

Aus den oben genannten Gründen wurde das Verfahren der Synthese leicht modifiziert. Zunächst erfolgte die Kristallisation der Partikel im ersten Reaktor, von dort führte ein Überlauf in den zweiten Reaktor. Hier wurde dann das Polymer zugesetzt, um die Kolloide zu funktionalisieren und eine weitere Reifung der Partikel zu verhindern [145].

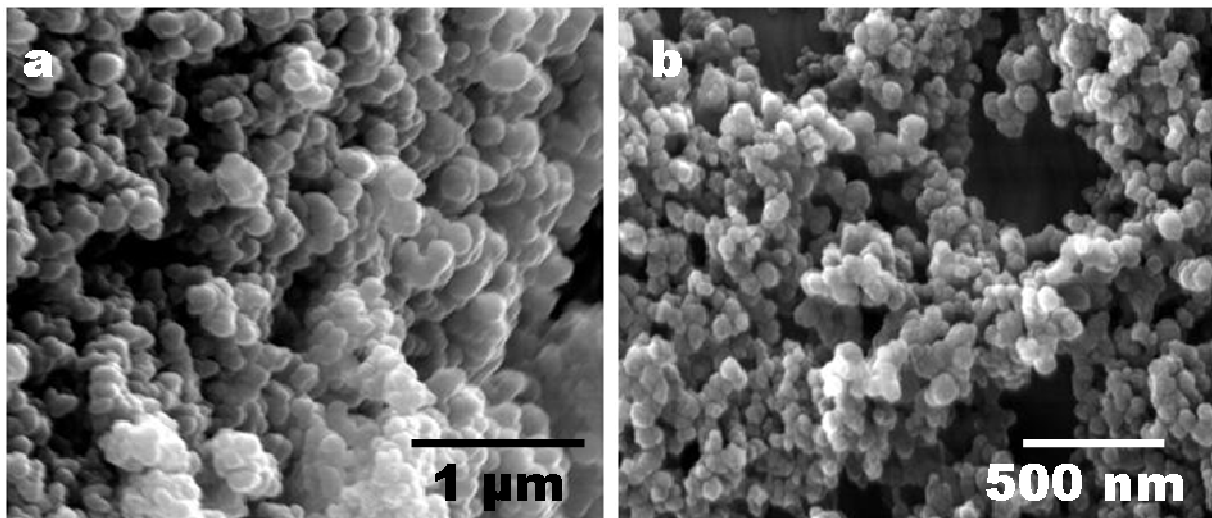


Abbildung 11: REM-Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln aus der zweistufigen Synthese, funktionalisiert mit PVP (a) und (b).

Bei der Untersuchung der Morphologie dieser Partikel im REM (Abbildung **11a** und **11b**), konnten keine Unterschiede zu der einstufigen Synthese gefunden werden. Die Kolloide waren sphärisch mit einem mittleren Durchmesser von 50-80 nm. Die Ergebnisse der dynamischen Lichtstreuung differierten für geladene Polymere nicht, nur für ungeladene Polymere wie PVP wichen die Werte ab, dies lag aber an der ohnehin nicht stabilen Dispersion und der damit einhergehenden fehlerhaften Messung.

3.1.3 Synthese im Rohrreaktor

Die Ergebnisse der Elementaranalyse ließen auf einen gewissen Anteil von Carbonat in den Kolloiden schließen. Da kein Carbonat zugesetzt wurde, konnte es sich nur um eine Reaktion der basischen Lösungen mit atmosphärischen CO_2 handeln. Um den Einfluss des CO_2 aus der Luft in den offenen Reaktoren zu minimieren, wurde die zweistufige Synthese, mit den nicht abgeschlossenen Rührreaktoren in einen geschlossenen Rohrreaktor umgewandelt. Über ein Y-Stück wurden die Calcium- und Phosphat-Lösungen zusammengepumpt, und die Partikel präzipitierten im ersten Schlauchteil. Über ein weiteres Y-Stück wurde das Funktionalisierung-Agens zugegeben. Die Verweilzeit ließ sich über die Pumpgeschwindigkeit einstellen. Ebenso ließ sich die Konzentration an Polymer leicht variieren, wenn das Polymer über eine zweite regelbare Peristaltikpumpe zugegeben wurde (Abbildung 12). Mit diesem System ließ sich auch leicht über die Schlauchlänge die Verweilzeit der Partikel verändern. In Abhängigkeit von der Verweilzeit im Reaktor ließen sich verschiedene Charakteristika der Nanopartikel finden [142].

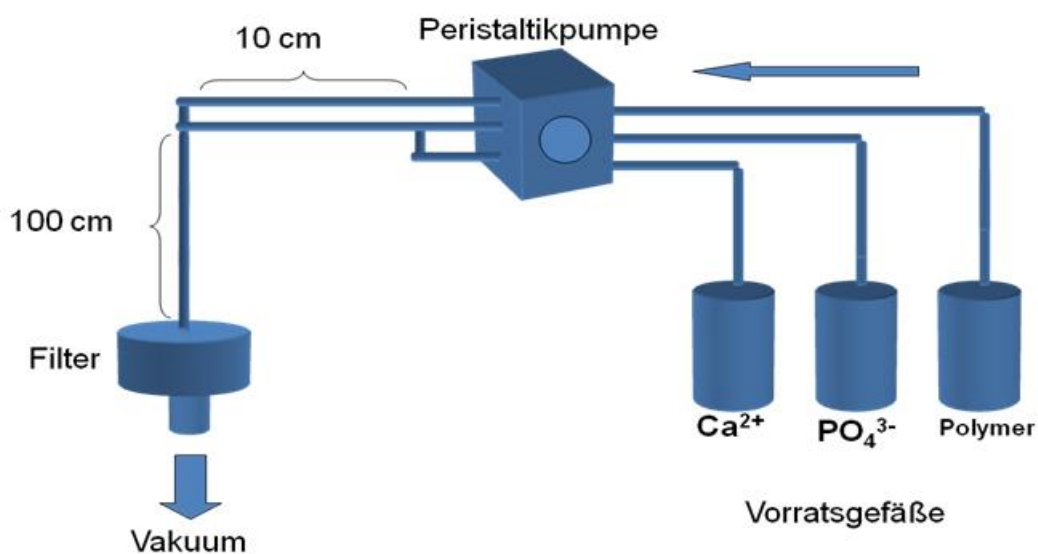


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Synthese im Rohrreaktor.

Die Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen der Kolloide im REM ergaben auch für diese Variante der Synthese die typischen Größenverteilungen. Eine repräsentative Auswahl der im REM gefundenen Partikelmorphologien findet sich in Abbildung 13. Neben einigen größeren Partikeln (150 nm) sind die meisten der Kolloide ziemlich uniform und haben einen mittleren Teilchendurchmesser von 50-80 nm. Die Partikel haben alle

eine sphärische Form und entsprechen in ihrer Morphologie den bereits zuvor synthetisierten Kolloiden aus der einstufigen und zweistufigen Synthese.

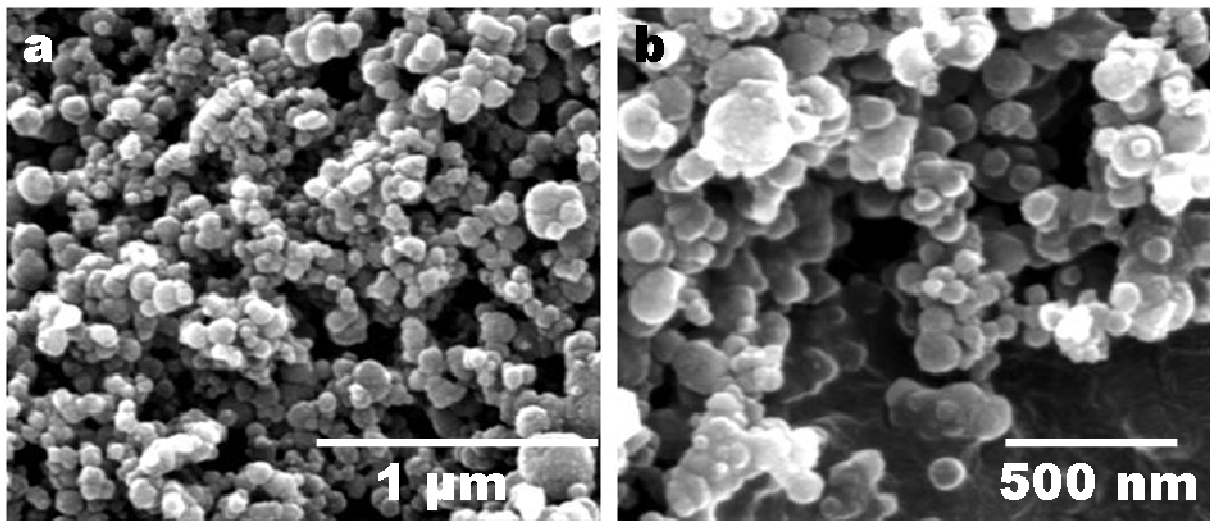


Abbildung 13: REM-Aufnahme von Calciumphosphat-Nanopartikeln aus der Rohrreaktor-Synthese, funktionalisiert mit PVP (a) und (b).

3.2 Funktionalisierungen der Calciumphosphat-Nanopartikel

Um die bekannten Daten aus der in der ein- und zweistufigen Synthese funktionalisierten Partikel aus der Literatur zu bestätigen [146], wurden die Partikel aus dem Rohrreaktor mit kationischen Polymeren (PAH, PEI) bei verschiedenen Konzentrationen funktionalisiert, um das Zetapotential-Maximum zu bestimmen. Ebenso wurden als anionisches Polymer PSS und als ungeladenes Polymer PVP verwendet.

3.2.1 Funktionalisierung mit PSS

Die Funktionalisierung mit PSS erfolgte bei verschiedenen Konzentrationen an Polymer, um den Vergleich zu den bekannten Daten aus der einstufigen Synthese zu haben. Die Ergebnisse der DLS-Messungen entsprachen auch den älteren Daten der anderen Synthesewege. Eine kurze Übersicht der erzielten Ergebnisse findet sich in den Abbildungen **14** und **15**. Man erkennt deutlich die breite Verteilung mit vielen Agglomeraten bei kleineren Polymerkonzentrationen und die Veränderung der Verteilungskurve zur schlanken Gausskurve bei zunehmender Polymerkonzentration. Die Ergebnisse der

Zetapotential-Messungen entsprechen den Größenverteilungen. Mit zunehmender Polymerkonzentration steigt das Zetapotential an, und die Stabilität der Dispersion nimmt zu.

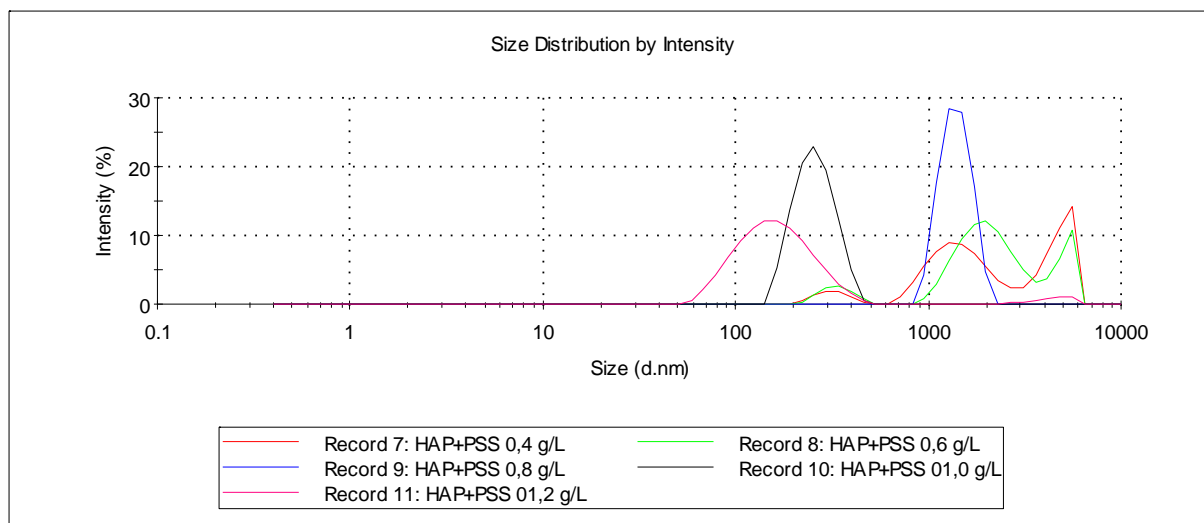


Abbildung 14: Größenverteilung der Calciumphosphat-Nanopartikel bei verschiedenen Konzentrationen an PSS; gefällt bei einem pH-Wert von 10.

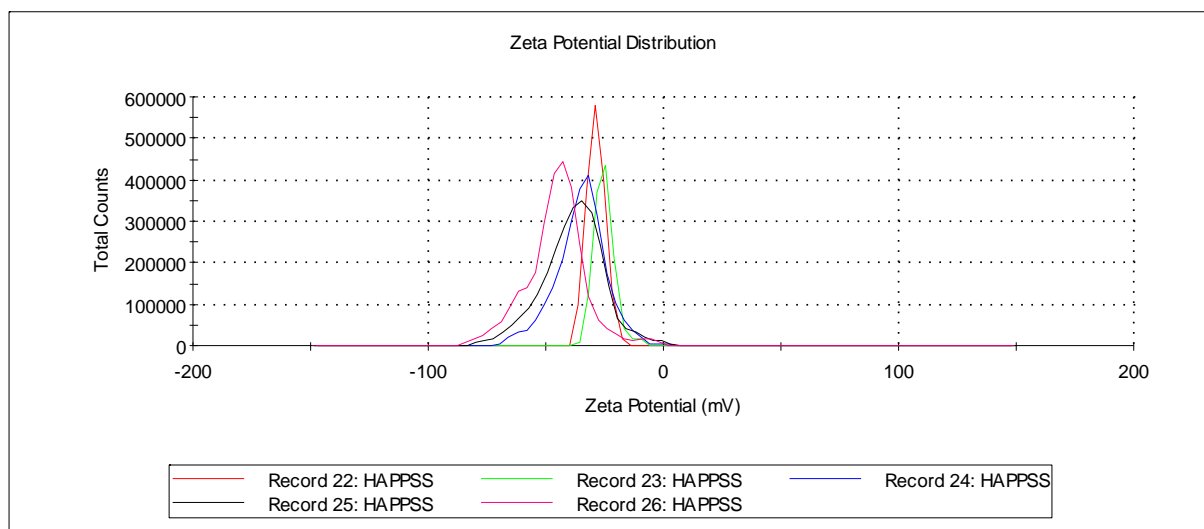


Abbildung 15: Zetapotential der Calciumphosphat-Nanopartikel bei verschiedenen Konzentrationen an PSS; gefällt bei einem pH-Wert von 10.

Probe	cPSS/ g L ⁻¹	Zeta-Potential /mV (Record)	Durchschnittliche Größe /nm	PDI	Leitfähigkeit /mS cm ⁻¹
Rec. 7	0,4	-28 ± 4 (22)	2050	0,57	1,21
Rec. 8	0,6	-25 ± 4 (23)	1500	0,43	1,33
Rec. 9	0,8	-35 ± 1, (24)	1400	0,23	1,47
Rec. 10	1	-38 ± 13 (25)	250	0,12	1,57
Rec. 11	1,2	-46 ± 12 (26)	160	0,07	1,77

Tabelle 3: Ergebnisse der Funktionalisierung mit PPS bei verschiedenen Konzentrationen.

Die Auswertung der Fällungen bei verschiedenen Konzentrationen an Polymer ergab keinen Unterschied zu den älteren Daten. Bei einer Konzentration von einem Gramm pro Liter ließen sich stabile, monodisperse Systeme erzeugen. Das Zetapotential steigt bis zu einer bestimmten Konzentration an, um dann zu stagnieren [147]. Das Maximum der Größenverteilung liegt mit >100 nm laut Abbildung 14 über den morphologischen Daten des REM. Bei der Bestimmung der Größenverteilung durch dynamische Lichtstreuung wird jedoch immer der hydrodynamische Radius berechnet, der immer über dem tatsächlichen Radius liegt. Die Stabilität einer mit PSS funktionalisierten Dispersion ist hervorragend. Selbst Monate nach der Synthese ist die Dispersion noch immer nicht sedimentiert. Das Maximum der Größenverteilung hatte sich lediglich auf 200 nm verschoben.

3.2.2 Funktionalisierung mit PAH

Die mittels DLS erzielten Ergebnisse der mit PAH funktionalisierten Nanopartikel entsprechen ebenfalls den bekannten Daten aus der einstufigen und zweistufigen Synthese [144, 148]. Ab einer Konzentration von 0,8-1 g L⁻¹ ergibt sich eine relativ gute Größenverteilung mit einem entsprechend hohen Zetapotential (Abbildung 16 und 17).

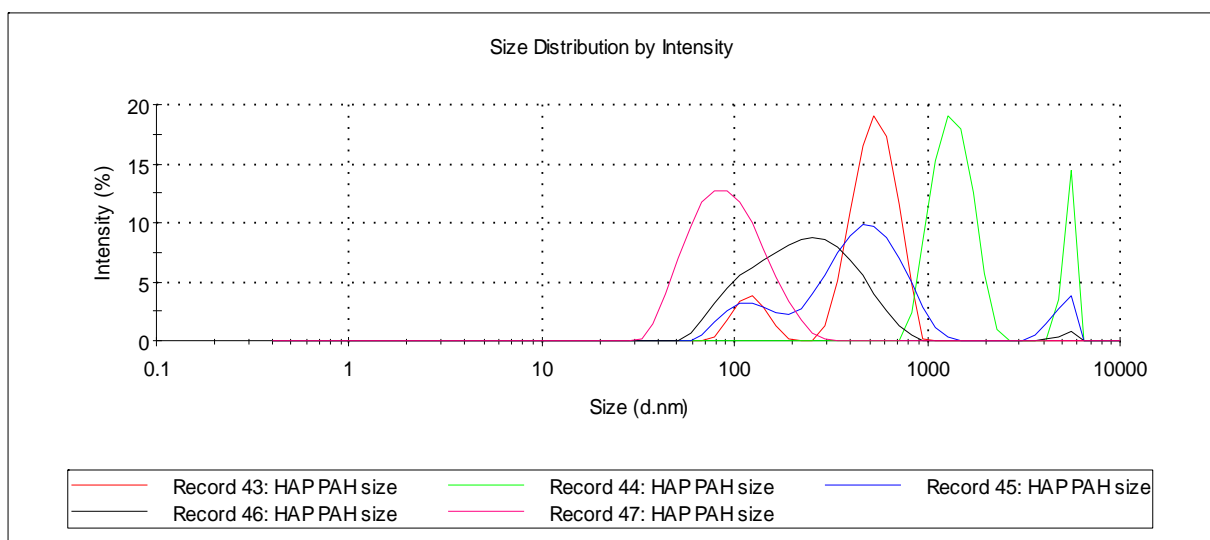


Abbildung 16: Größenverteilung der Calciumphosphat-Nanopartikel bei verschiedenen Konzentrationen an PAH; gefällt bei einem pH-Wert von 10.

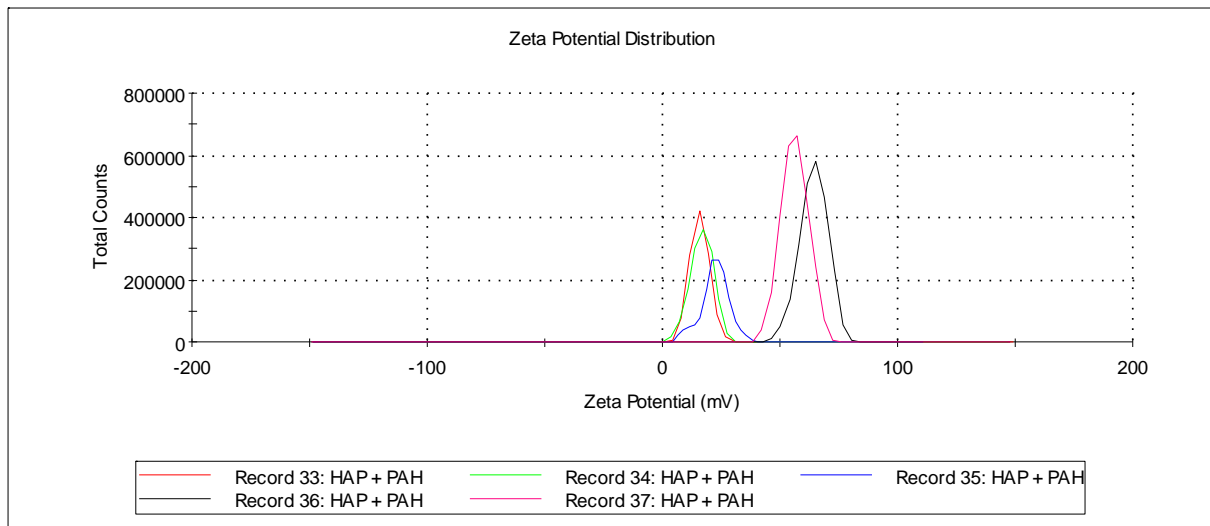


Abbildung 17: Zetapotential der Calciumphosphat-Nanopartikel bei verschiedenen Konzentrationen an PAH; gefällt bei einem pH-Wert von 10.

Probe	c(PAH)/ g L ⁻¹	Zeta-Potential /mV (Record)	Durchschnittliche Größe /nm	PDI	Leitfähigkeit /mS cm ⁻¹
Rec. 34	0,4	16 ± 4 (33)	650	0,56	1,44
Rec. 35	0,6	17 ± 5 (34)	3000	0,52	1,53
Rec. 36	0,8	22 ± 6 (35)	380	0,43	2,52
Rec. 37	1	44 ± 6 (36)	200	0,26	1,66
Rec. 38	1,2	44 ± 6 (37)	80	0,14	1,67

Tabelle 4: Ergebnisse der Funktionalisierungen mit PAH.

Für eine gute Interpretation der durch die DLS erzielten Ergebnisse ist es erforderlich zu verstehen, wie der mathematische Algorithmus zur Berechnung der Größenverteilung arbeitet. Die Angabe des Programms zur mittleren Teilchengröße von 82,4 nm erscheint zunächst sehr präzise. Eine genaue Betrachtung der Verteilungskurve zeigt einen Anfang der Kurve bei 30 nm und ein Ende bei 300 nm. Die Existenz von 30 nm großen Partikeln in der Dispersion ist aber eher unwahrscheinlich, da sich im REM Partikel dieser Größe nicht haben finden lassen. Die Berechnung der Größenverteilung ergibt immer eine gaussförmige Verteilung in der Statistik. Je schmaler die Gausskurve, umso kleiner der Polydispersitätsindex (PDI). Aus diesem Grund ergibt es keinen Sinn, die Größe der Partikel mit einer Angabe auf ein Angström genau anzugeben. Die mittlere Größe der Kolloide kann eher mit ca. 100 nm angegeben werden. Dies bezieht sich aber auch auf den hydrodynamischen Radius. Für die genaue Größe bietet sich die Bestimmung im REM an. Die Aufnahmen der Nanopartikel, die in den verschiedenen Reaktortypen hergestellt wurden, zeigen keinen Unterschied in den Partikelmorphologien. Die durchschnittliche Teilchengröße liegt bei etwa 50-80 nm.

3.2.3 Funktionalisierung mit PVP

Der Einsatz von Polyvinylpyrrolidon zur Funktionalisierung hat drei Vorteile. Zum Ersten ist es ein wasserlösliches Polymer, dadurch lässt es sich für die Synthese überhaupt erst verwenden. Der zweite ist der, dass es zwar in Wasser die Partikel nicht hinreichend stabilisieren kann (Abbildung 18), aber in 2-Propanol zu stabilen Dispersionen der Nanopartikel führt. Aus diesen alkoholischen Dispersionen lassen sich polarisierbare Substrate hervorragend beschichten. Der dritte Vorteil des PVP ist die Tatsache, dass es bereits als medizinischer Zusatzstoff zugelassen ist. Es hat die Fähigkeit Iod zu komplexieren, und wird dann in Salben oder Lösungen unter dem Handelsnamen Povidon geführt. Als Lebensmittelzusatzstoff wird es verwendet zur Klärung von Bier, Wein und Fruchtsaft. In der EU-Lebensmittelverordnung findet man es unter der E-Nummer E1201.

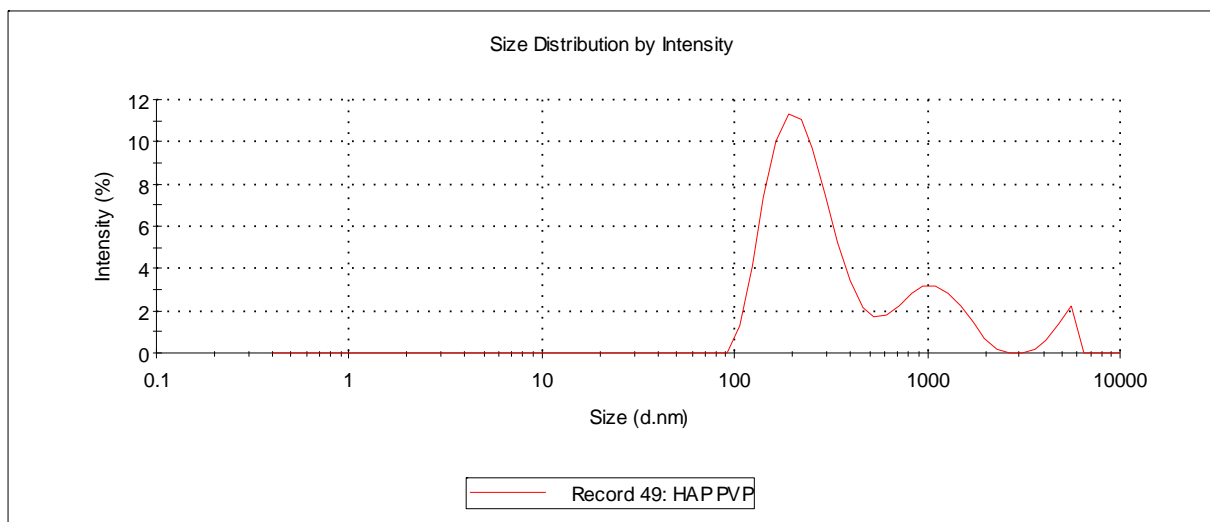


Abbildung 18: Funktionalisierung mit PVP in Wasser führt zu Agglomeraten, stabile Dispersionen sind bei keinen pH-Werten von 8-12 möglich.

Xi et al. zeigten, dass PVP als Beschichtung die Proliferation von Osteoblasten-artigen MC3T3 Zellen begünstigt [149]. Wang et al. zeigten, dass PVP nur in hohen Dosierungen die Apoptose von Zellen auslöst [123]. Da die Funktionalisierung der Partikel im Bereich von 1-2 % liegt, kann davon ausgegangen werden, dass diese geringe Menge keinen positiven Effekt hat, aber den Zellen auch auf jeden Fall nicht schaden kann.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 19 zeigen eindrucksvoll die sphärischen Partikel mit einer einheitlichen Morphologie und Größe. Auch hier sind neben einigen größeren Partikeln diejenigen sichtbar, deren Größe recht einheitlich bei 50-80 nm liegt.

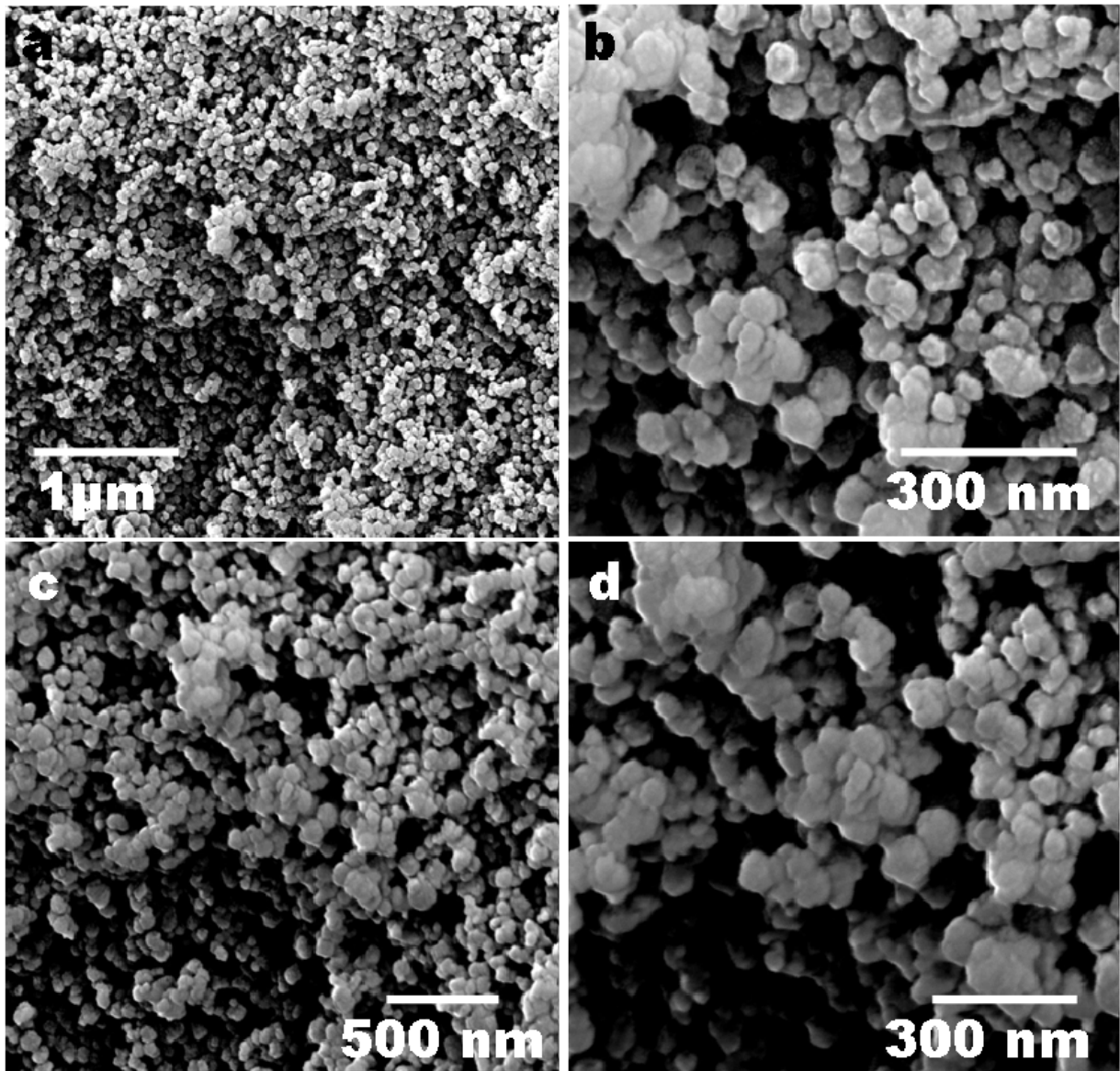


Abbildung 19: REM-Aufnahmen von PVP-funktionalisierten Kolloiden; gefällt bei einem pH-Wert von 10.

Die Pulverdiffraktogramme von PVP-funktionalisierten Partikeln, die in einem pH-Bereich von 8-10,5 gefällt wurden, zeigen nach 24 h Trocknung bei 37 °C im Trockenschrank breite Peaks, die auf Hydroxylapatit hindeuten (Abbildung 20). Auch dies stimmt mit den Ergebnissen aus der älteren einstufigen Synthese überein. Bei einer Erhöhung des pH-Werts über diesen Bereich hinaus, entsteht eine amorphe Phase aus Calciumphosphat, die im REM keinerlei

nanopartikuläre Struktur zeigt. Die Erklärung hierfür liefert ein Blick in die Gleichgewichtslage des Systems HPO_4^{2-} und PO_4^{3-} . Ab einem pH-Wert von 11 beginnt das PO_4^{3-} zu dominieren und führt dann entsprechend zu anderen Phasen [150].

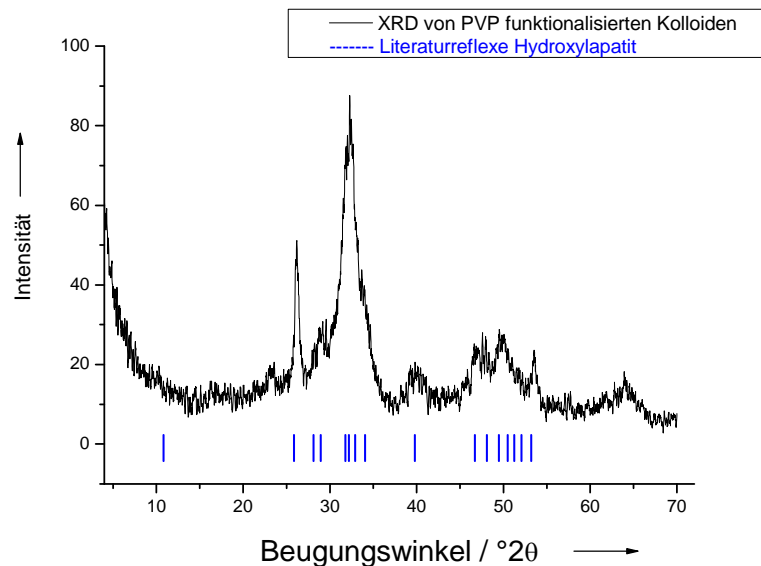


Abbildung 20: XRD von PVP-funktionalisierten Kolloiden gefällt bei pH 9 und gewaschen mit 2-Propanol. Die Trocknung erfolgte für 24 h an Luft im Trockenschrank bei 37°C.

3.2.4 Funktionalisierung mit Polyethylenimin (PEI)

Die Verwendung von Polyethylenimin zur Funktionalisierung sollte eine preisgünstigere Alternative zum PAH bieten. Vom PEI sind verschiedene Molekulargewichte und wässrige Lösungen kommerziell erhältlich. PEI wird wie in der Literatur vielfach beschrieben bereits vielfältig für Beschichtungen und Einsätze mit zellbiologischem Hintergrund verwendet [68, 151, 152]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Molekulargewichte des PEI verwendet; eines mit 750 kD und eines mit 10 kD. Aufgrund der mit zunehmendem Molekulargewicht ansteigenden Viskosität ist die 750 kDa-Variante nur als 50 %ige wässrige Lösung erhältlich. Die Daten der DLS zeigten aber für keines der Polymere eine hinreichende Stabilisierung in wässrigem Medium (Abbildung 21). Die Ergebnisse der Zetapotential-Messungen können aufgrund der Agglomeration auch nur mit Vorsicht genutzt werden. Als höchster Wert wurde +20 mV bestimmt. Ein Zetapotential dieser Größe ist für

eine elektrostatische Stabilisierung zu gering. Aber auch das hohe Molekulargewicht eines Polymers sorgte nicht für eine sterische Stabilisierung. Die so synthetisierten Kolloide konnten abfiltriert und in 2-Propanol redispergiert werden.

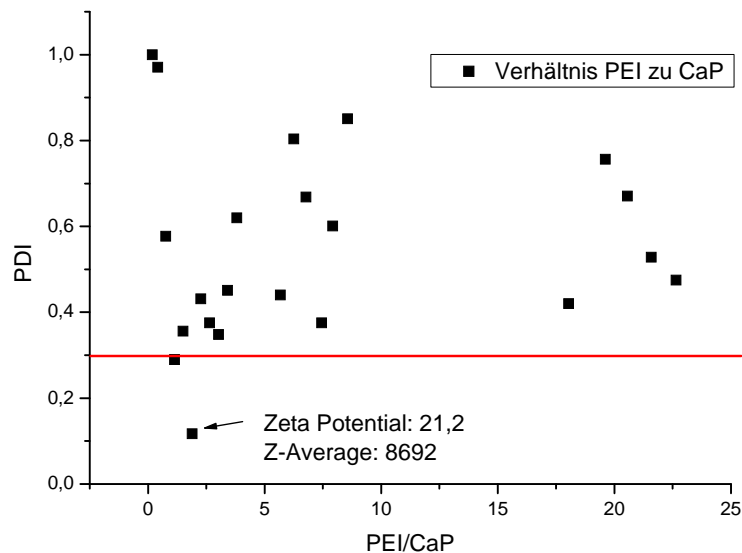


Abbildung 21: Darstellung des PDI in Abhängigkeit vom PEI/Calciumphosphat Verhältnis. Eine stabile Dispersion in Wasser konnte nicht erzielt werden. (Darstellung von PEI mit 750 kDa, mit 10 kDa ähnliches Resultat)

Eine Redispergierung der Partikel in 2-Propanol war nach einer Behandlung im Ultraschallbad möglich. Die Größenverteilung in der DLS zeigt eine gaussförmige Verteilungskurve mit einem Maximum bei 300 nm (Abbildung 22). Die Dispergierung war also nicht vollständig möglich. Einige Partikel waren zu kleineren Agglomeraten verklumpt, die Dispersion an sich verhielt sich aber stabil, eine Sedimentation trat nicht auf. Die Stabilität bezieht sich jedoch nur auf den beobachteten Zeitraum von vier Monaten. Da die Dispersion nicht monodispers war, trat eine Alterung und folgende Agglomeration auf. Die Geschwindigkeit dieses Vorgangs war aber langsam genug, um die Dispersion über mehrere Monate zu lagern, ohne dass sie in ihrer Verwendung beeinträchtigt wurde.



Abbildung 22: Größenverteilung von PEI-funktionalisierten Kolloiden nach Redispergierung in 2-Propanol.

Um die Frage nach der weiteren Partikelzusammensetzung zu klären, wurden EDX-Messungen an den Partikeln im REM durchgeführt. Die Quantifizierung der Peaks ergab ein atomares Calcium- zu Phosphatverhältnis von 1,67 (Abbildung 23). Die Signale für Palladium stammten aus der Gold/Palladium-Legierung des Bedampfers. Eine Quantifizierung des Kohlenstoffanteils des Polymers war nicht möglich, da aufgrund des Graphitklebers zur Fixierung der Probe immer Kohlenstoff im EDX auftauchte.

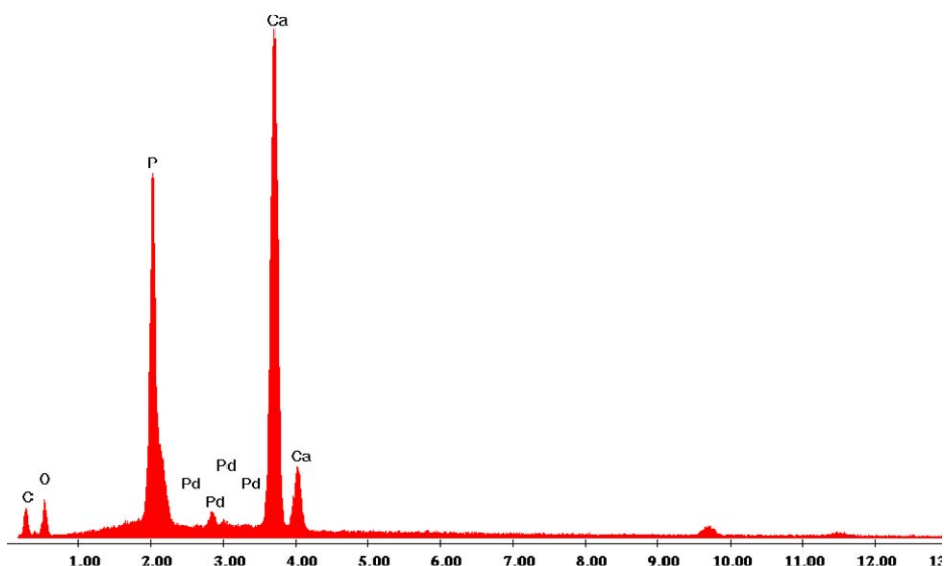


Abbildung 23: EDX-Spektrum von PEI funktionalisierten Kolloiden nach der Trocknung. Das Ca/P-Verhältnis beträgt 1,67.

Die Thermolyse einer Probe von PEI-funktionalisierten Kolloiden liefert als Ergebnis einen Wasseranteil von 12 – 20 %, in Abhängigkeit der Trocknungsmethode und –dauer (siehe Kapitel **3.3.1-3.3.3**). Bei 340 °C ist die große Bande von CO₂ sichtbar, was die Verbrennung des Polymers anzeigt. Ein kleines Signal bei 640 °C ist durch die Zersetzung des Carbonats in den Partikeln zu erklären. Die „kammartigen“ Banden des Wassers finden sich während der gesamten Aufzeichnungsdauer im Spektrum wieder. Der Verlust von Wasser aus den Partikeln erfolgt offensichtlich über einen langen Zeitraum. Dies deutet auf stark gebundenes Wasser hin und nicht auf eine feuchte, unzureichend getrocknete Probe (Abbildung **24**).

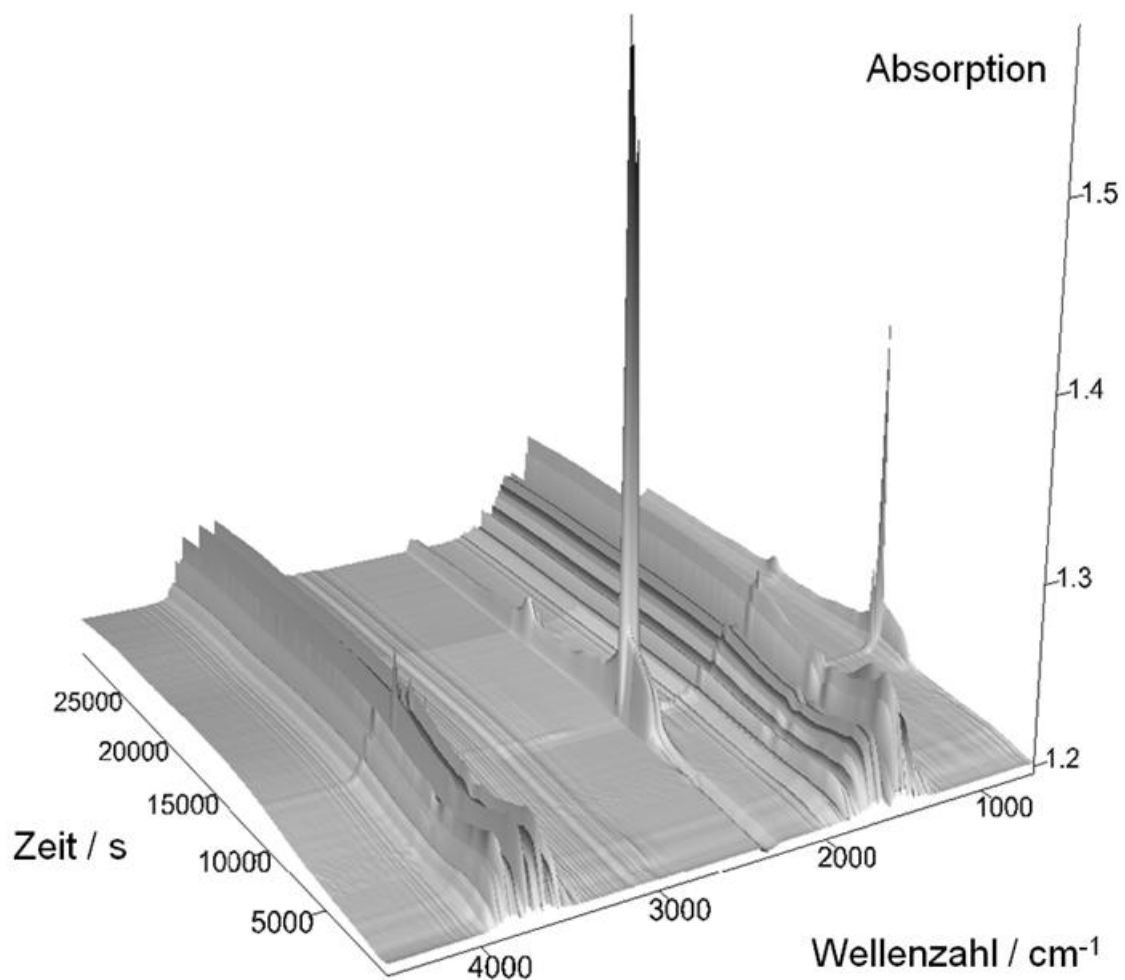


Abbildung 24: Pseudo-3D-Darstellung der IR-Spektren während der Thermolyse von PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikel. Die Heizrate betrug während der Messung 3 K min⁻¹.

3.2.5 Zusammenfassung der Partikelsynthesen und Funktionalisierungsexperimente

Eine Übersicht zu den erzielten Resultaten findet sich in Tabelle 5. Von den eingesetzten Polymeren führten nur PSS und PAH zu stabilen wässrigen Dispersionen, in denen die Nanopartikel monodispers vorlagen. Bei allen anderen Polymeren führte kein Weg zu einer stabilen Dispersion; innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden waren alle Partikel sedimentiert. Die im REM bestimmten Partikelgrößen lagen bei allen Synthesen einheitlich bei 50-80 nm. Die Ca/P-Verhältnisse von allen Synthesen lagen zwischen 1,5 und 1,8 bei einer Bestimmung durch die Elementaranalyse (Ca^{2+} , PO_4^{3-}). Dies deutet darauf hin, dass die dominierende Phase der Partikel Hydroxylapatit ist, aber noch weitere Phasen, wie z. B. eine amorphe, enthält uns so vom Ca/P-Verhältnis von Hydroxylapatit (1,67) abweicht. Die durch EDX bestimmten Zusammensetzungen (1,66-1,70) liegen eher im Bereich von Hydroxylapatit. Die in der Elementaranalyse bestimmten Anteile an Polymer lagen bei 1-2 %, mit Ausnahme des PEI bei dem der Anteil bei 3-4 % lag. Dies lässt sich durch die vernetzte Struktur des PEI erklären. Sowohl die 750 kDa-Variante als auch die 10 kDa-Variante adsorbieren als größere Knäuel auf den Partikeln als die linearen Polymere. Die Möglichkeit, die Partikel nach der Synthese und Trocknung in 2-Propanol zu redispergieren, hing vermutlich von der Trocknungsmethode ab. Eine Untersuchung in dieser Hinsicht wird in Kapitel 3.3 behandelt.

Adsorbens	kein	PSS	PAH	PVP	PEI
Teilchengröße (durch DLS)	agglomertiert (alle Synthesen)	100 nm (1-stufig) 100 nm (2-stufig) 100 nm (Rohrreak.)	100 nm (1-stufig) 100 nm (2-stufig) 100 nm (Rohrreak.)	agglomertiert (alle Synth.)	agglomertiert (Rohrreak.)
Zetapotential (durch DLS)	ungeladen (alle Synthesen)	-40 ± 13	+36 ± 6	ungeladen (alle Synth.)	-20 (Rohrreak.)
PDI	1 (alle Synthesen)	0,17 (Rohrreak.)	0,15 (Rohrreak.)	1 (alle Synth.)	0,3-1 (alle Synthesen)
Teilchengröße (durch REM)	50-80 nm (alle Synthesen)	50-80 nm (alle Synthesen)	50-80 nm (alle Synthesen)	50-80 nm (alle Synth.)	50-80 nm (Rohrreak.)
Ca/P Verhältnis (Elementar-analyse)	1,3-1,5 (1-stufig) 1,5-1,8 (2-stufig) 1,6-1,7 (Rohrreak.)	1,3-1,5 (1-stufig) 1,5-1,8 (2-stufig) 1,5-1,7 (Rohrreak.)	1,4-1,5 (1-stufig) 1,5-1,8 (2-stufig) 1,5-1,7 (Rohrreak.)	1,4-1,5 (1-stufig) 1,5-1,8 (2-stufig) 1,5-1,7 (Rohrreak.)	- (1-stufig) - (2-stufig) 1,5-1,6 (Rohrreak.)
Ca/P Verhältnis (EDX)	- (1-stufig) - (2-stufig) 1,69 (Rohrreak.)	- (1-stufig) - (2-stufig) 1,56 (Rohrreak.)	- (1-stufig) - (2-stufig) 1,55 (Rohrreak.)	- (1-stufig) - (2-stufig) 1,67 (Rohrreak.)	- (1-stufig) - (2-stufig) 1,67 (Rohrreak.)
Teilchengröße nach Redisperion in 2-Propanol	- (1-stufig) 400 nm (2-stufig) 400 nm (Rohrreak.)	- (1-stufig) - (2-stufig) 250 nm (Rohrreak.)	- (1-stufig) - (2-stufig) 300 nm (Rohrreak.)	- (1-stufig) 400 nm (2-stufig) 250 nm (Rohrreak.)	- (1-stufig) 400 nm (2-stufig) 250 nm (Rohrreak.)
Anteil Polymer (Elementar-analyse)	1-2 %	1-2 %	1-2 %	1-2 %	3-4 %

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Synthesen mit verschiedenen Funktionalisierungen.

3.3 Einfluss der Trocknungsmethoden auf die Kristallinität und das Agglomerationsverhalten

Allen Synthesewegen war folgendes gemein: Die Trocknung der Partikel an Luft führte unweigerlich zu einem so starken Zusammenhaften der Partikel, dass eine Redispersion auch nach einer mehrstündigen Behandlung im Ultraschallbad nicht möglich war. Ziel sollte es aber sein, eine lagerfähige Form der Kolloide zu entwickeln, bei denen sie ihre Eigenschaften nicht verlieren. Wenn die Kolloide längere Zeit im Wasser aufbewahrt werden, erfolgt immer die Auflösung der nanokristallinen Partikel unter Ausbildung der thermodynamisch stabilsten Phase, makroskopischem Hydroxylapatit. Damit geht die Eigenschaft der Partikel, „Nano“ zu sein, verloren. Solange die Partikel eine gewisse Restfeuchte von der Synthese hatten, ließen sie sich problemlos im Alkohol redispergieren. Das Problem war dann die exakte Kenntnis der Konzentration der Partikel in Lösung. Die Masse eines trockenen Pulvers lässt sich exakt durch Wiegen bestimmen. Ist noch Feuchtigkeit in der Substanz enthalten, so muss diese ebenfalls bestimmt werden, um dann von der Einwaage abgezogen zu werden. Ein trockenes lagerfähiges Pulver, dessen Nanopartikel sich wieder redispergieren lassen, wäre das wünschenswerte Ziel, oder eine Formulierung auf alkoholischer Basis mit bekannter Konzentration an Nanopartikeln. Hierfür müsste dann bei jedem neuen synthetischen Ansatz das Verhältnis von Calciumphosphat zu Dispergiermittel neu bestimmt werden. Für eine industrielle Anwendung wäre ein immer wieder identisches Produkt gewünscht; dies wäre so nicht der Fall und damit ungeeigneter. Das Interesse an einem getrockneten Produkt, das sich dann formulieren lässt, ist vermutlich größer.

3.3.1 Ergebnisse der Trocknung an Luft nach Waschung mit Wasser

Am einfachsten erschien der Weg, die Kolloide nach der Filtration noch auf dem Filter mit Wasser zu waschen, um die überschüssigen Gegenionen (NH_4^+ , Lactat) aus den Ausgangslösungen zu entfernen. Hiernach schloss sich dann eine Trocknung im Trockenschrank bei 37 °C für 2 Tage an. Die Versuche zur erneuten Dispergierung lieferten keine stabile Dispersion. Aus den zu kleinen „Schollen“ getrockneten Kolloiden ließ sich auch nach einer Behandlung im Ultraschallbad keine Dispersion mehr herstellen. Die Ergebnisse der DLS zeigten alle Anzeichen eines agglomerierenden Systems (hoher PDI, nicht-exponentieller Abfall der Autokorrelationsfunktion). Es macht weiterhin aus technischer Sicht keinen Sinn, über ein „*Bottom-Up*-Verfahren“ erst die Nanopartikel herzustellen, um sie dann mit hohem technischem Aufwand nach der Trocknung zerkleinern zu müssen.

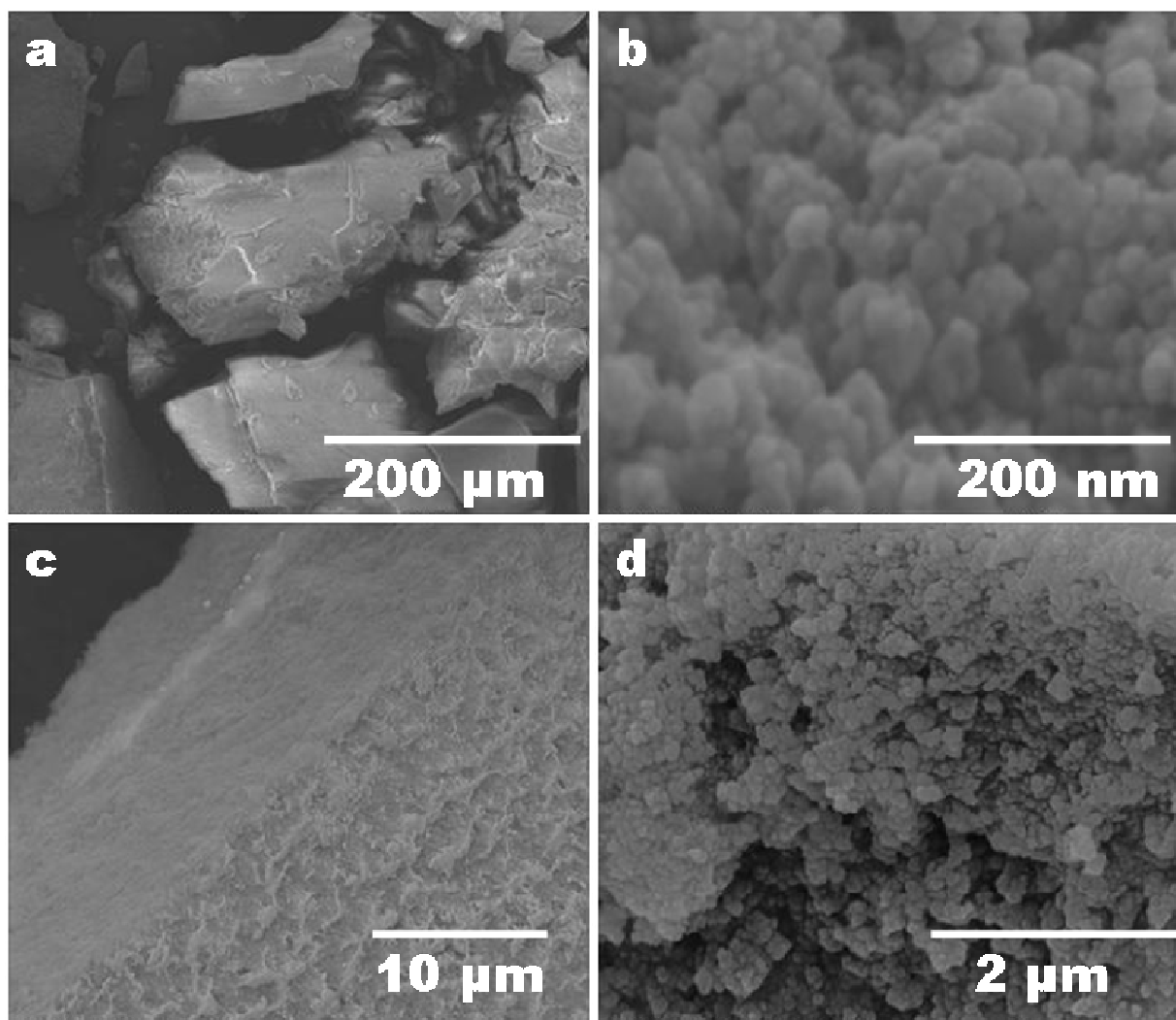


Abbildung 25: REM-Aufnahmen von an Luft getrockneten CaP-Nanopartikeln; ohne Funktionalisierung (a und b) und mit PSS-funktionalisierten Kolloiden (c und d).

Die REM-Aufnahmen in Abbildung **25** zeigen in **a** und **b** unfunktionalisierte und in **c** und **d** PSS-funktionalisierte Nanopartikel nach der Trocknung an Luft. Es erfolgte keine Waschung der Partikel mit Alkohol. Das Material besteht nach dem Trocknen aus kleineren Bruchstücken (Abbildung **25a**), die bei hoher Vergrößerung noch die 50 nm-großen Primärpartikel erkennen lassen. Diese sind stark agglomeriert und lassen die Unmöglichkeit einer Dispergierung nach dem Trocknungsprozess erkennen. Die Polymer-funktionalisierten Nanopartikel (Abbildung **25c** und **25d**: PSS-funktionalisiert) weisen identische Morphologien auf. Auch hiervon lassen sich keine Partikel mehr redispergieren. Die Polymerschicht auf den Kolloiden hat somit keinen Einfluss auf die Möglichkeit zur erneuten Dispergierung. Der Grund für das starke Zusammenhaften der Partikel liegt in der Oberfläche begründet. Bei der Fällung, oder genauer nach der Präzipitation der Nanopartikel, ist deren Partikeloberfläche hydratisiert [153-156]. Diese Schicht kann noch Ionen mit ihrer Umgebung austauschen. In dieser Schicht finden sich neben vielen Wassermolekülen noch Ca^{2+} , OH^- , HPO_4^{2-} , NH_4^+ , NH_3 , sowie anionische oder kationische Polymere. Diese werden beim Waschen mit Wasser nicht vollständig herausgelöst. Die so nebeneinander auf dem Filter liegenden Partikel liegen mit ihren hydratisierten Aussenschichten aneinander. Eine Trocknung führt dann durch weiteres Überschreiten des Löslichkeitsprodukts von Calciumphosphat zu einer Bildung von kristallinen Brücken zwischen den Partikeln. Die Bildung solcher Verbrückungen führt zur starken Agglomeration der Partikel und ist irreversibel. Durch eine Dispergierung in Wasser kann dann nur der äußere Bereich des Agglomerats erneut hydratisiert werden. Eine Trennung in monodisperse Partikel findet nicht mehr statt.

3.3.2 Ergebnisse der Trocknung an Luft nach Waschung mit 2-Propanol

Um das Problem der Bildung von kristallinen Verbrückungen zwischen den Partikeln bei der Trocknung zu vermeiden, wurde dazu übergegangen, den Filterkuchen nach dem Waschen mit Wasser zusätzlich mehrmals mit organischen Lösungsmitteln zu waschen. Hierzu wurden Ethanol, 2-Propanol, und Aceton verwendet. REM-Aufnahmen von verschiedenen Kolloiden mit unterschiedlicher Funktionalisierung finden sich in Abbildung 26. Es lässt sich hier ein deutlicher Unterschied zu den erhaltenen Morphologien in Abbildung 25 feststellen. Die gesamte Masse an Kolloiden wirkt poröser, und die einzelnen Partikel sind deutlicher erkennbar. Ein Unterschied zwischen den verschiedenen Funktionalisierungen findet sich hingegen nicht.

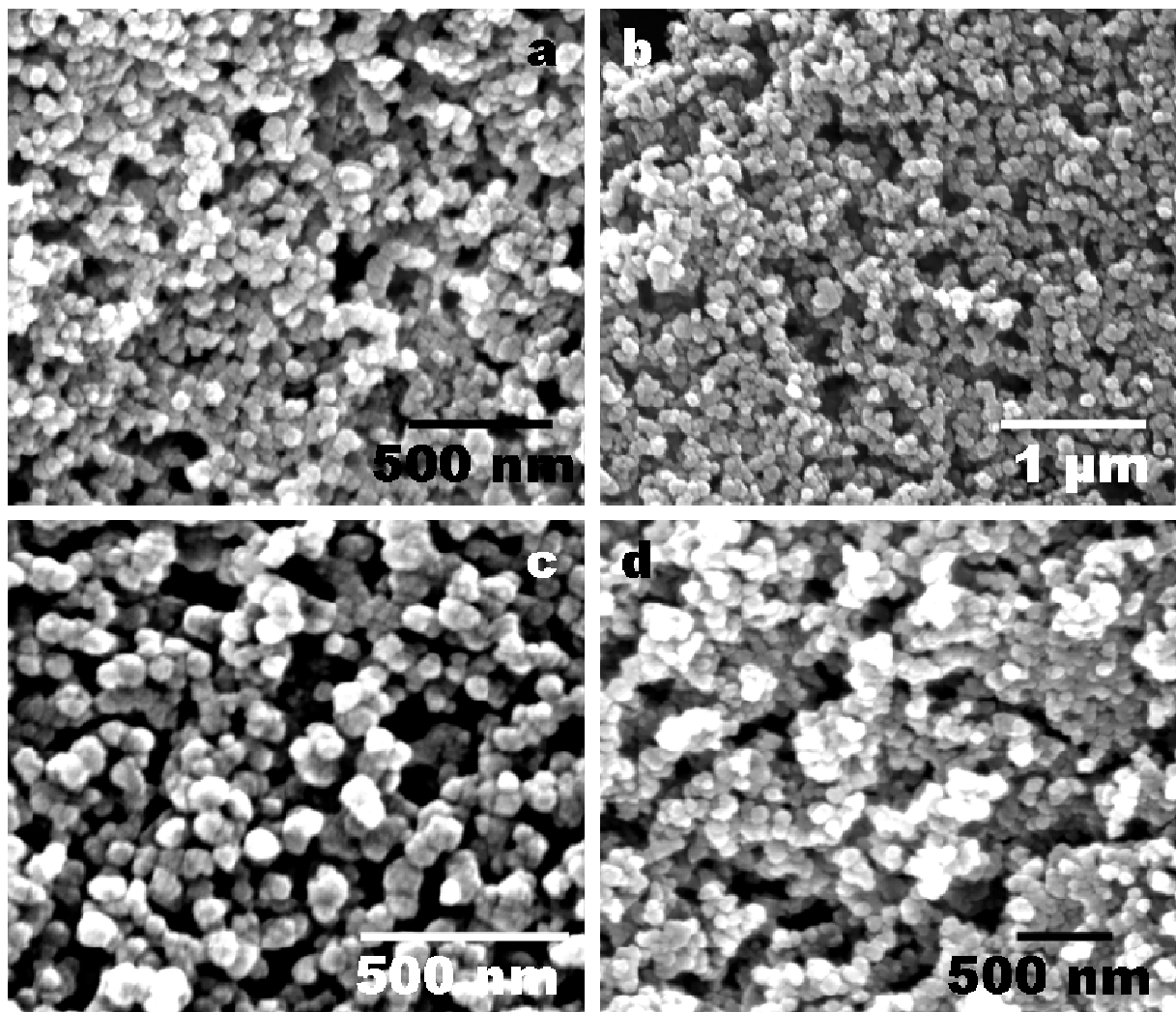


Abbildung 26: REM-Aufnahmen von an Luft getrockneten Kolloiden nach Waschung mit 2-Propanol, funktionalisiert mit PEI (a), PVP (b), PSS (c) und PAH (d).

Um festzustellen, ob sich durch den Waschprozess die kristallographische Phase des Materials geändert hatte, wurden Röntgen-Diffraktogramme aufgenommen. Ein repräsentatives Ergebnis findet sich in Abbildung 27. Die verbreiterten Banden sprechen für eine nanokristalline Phase, deren Zusammensetzung Hydroxylapatit ist. Amorphe Phasen sind mit dieser Methode nicht detektierbar.

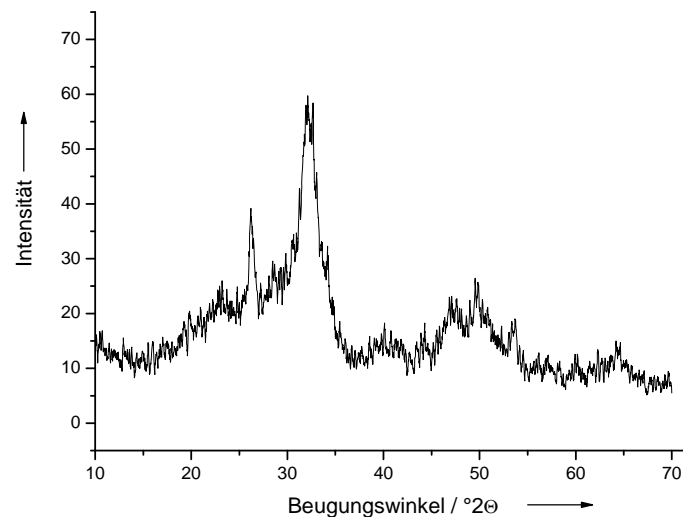


Abbildung 27: Diffraktogramm von PVP-funktionalisierten Nanopartikeln nach Waschung mit Alkohol und Trocknung bei 37°C für 48h im Trockenschrank. Die breiten Reflexe entsprechen den charakteristischen Banden für HAP.

Eine Redispergierung der Partikel nach der Trocknung ist möglich. Die Größenverteilung, die durch DLS bestimmt wurde, lässt eine Dispersion erkennen, die zwar stabil ist, aber aus kleineren Agglomeraten besteht, die eine Größe von ca. 400 nm (unfunktionalisierte Partikel) bis 250 nm (PVP funktionalisierte Partikel) haben. Für eine Dispergierung wurden 0,1 g Kolloide in 40 mL 2-Propanol gegeben und für 30 min im Ultraschallbad behandelt. Bei höheren Konzentrationen an Kolloiden tritt eine starke Agglomeration und folgende Sedimentation der Teilchen auf. Eine Lagerung der gewaschenen Partikel ohne weitere Trocknung ist in 2-Propanol ebenfalls möglich.

3.3.3 Ergebnisse der Gefriertrocknung (Lyophilisation)

Die Gefriertrocknung ist ein Standardverfahren der Technik, um Lebensmittel durch Trocknung haltbar zu machen. Ebenso wird die Gefriertrocknung in der pharmazeutischen Industrie zur schonenden Trocknung von Wirkstoffen genutzt. Es gibt bereits in der Literatur beschriebene künstliche Gewebematerialien aus Chitosan und Calciumphosphat, die über Gefriertrocknung präpariert wurden [157]. Die Gefriertrocknung lief hier in zwei Schritten ab. Die Haupttrocknung erfolgte bei 0,1 bar und 0 °C. Die tatsächliche Temperatur des Gefriergrundes lag bei der Trocknung immer unter den eingestellten 0 °C. Der Probentisch wird auf 0 °C geheizt, um die Sublimationsenthalpie des Wassers auszugleichen. Das Wasser wurde somit bei dem Trocknungsprozess nie flüssig. Die Sublimation des interpartikulären Wassers aus dem Präzipitat heraus dauerte 24 h. Die Nachtrocknung erfolgte bei 0,01 bar und 20 °C, ebenfalls über einen Zeitraum von 24 h. So sollte das intrapartikuläre Wasser aus den Kolloiden entfernt werden. Das Resultat war ein feines Pulver, welches sich gut in Alkohol im Ultraschallbad redispergieren ließ. Die Morphologie der Partikel ergab im REM keinen Unterschied zu den zuvor gefällten Partikeln (Abbildung 26).

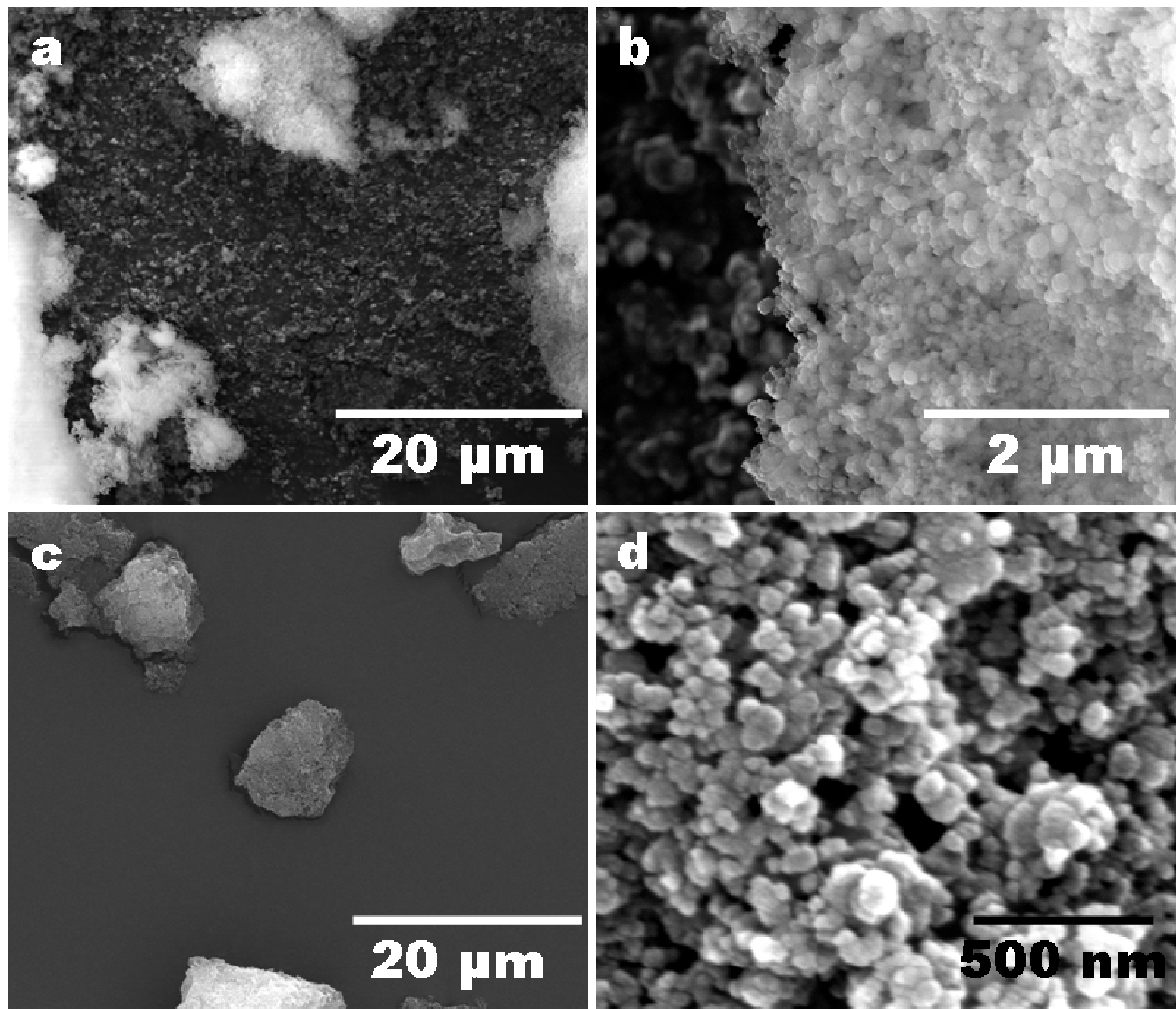


Abbildung 28: REM-Aufnahmen von lyophilisierten Kolloiden, funktionalisiert mit PVP (a und b) und PEI (c und d).

Die thermogravimetrischen Analysen ergaben für die so getrockneten Kolloide immer noch einen Wasseranteil von über 25 % bei den Kolloiden, die für 24 h (12 h Haupttrocknung, 12 h Nachtrocknung) getrocknet wurden. Nach 48 h (24 h Haupttrocknung, 24 h Nachtrocknung) Trocknung ist der Wassergehalt auf etwa 10 % gesunken.

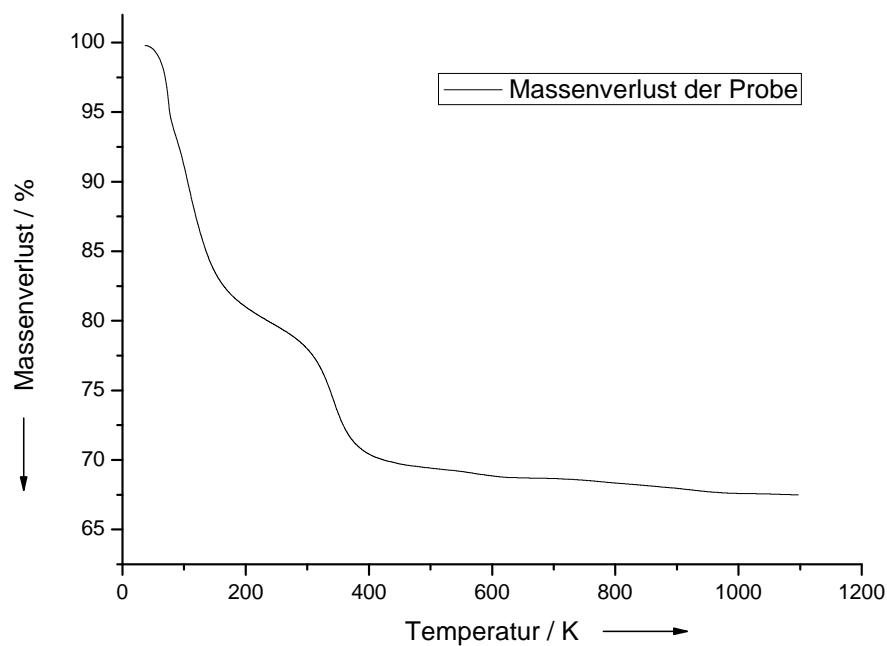


Abbildung 29: Thermogramm von 24 h (12 h Haupttrocknung, 12 h Nachtrocknung) lyophilisierten PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln (Heizrate 3 K min^{-1}). Der Massenverlust an Wasser beträgt etwa 30 %.

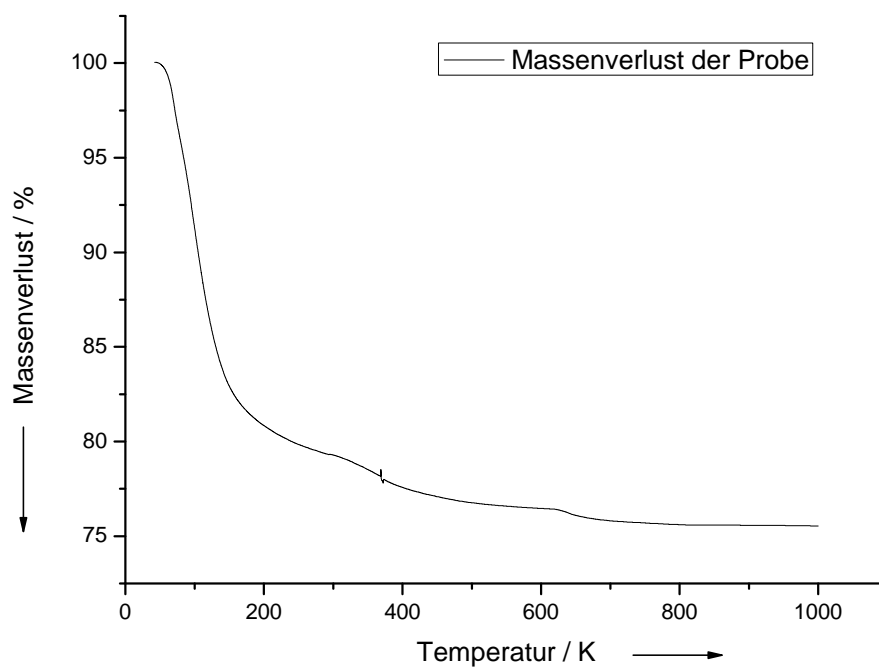


Abbildung 30: Thermogramm von 48 h (24 h Haupttrocknung, 24 h Nachtrocknung) lyophilisierten Kolloiden (Heizrate 3 K min^{-1}). Der Massenverlust an Wasser beträgt 12 %.

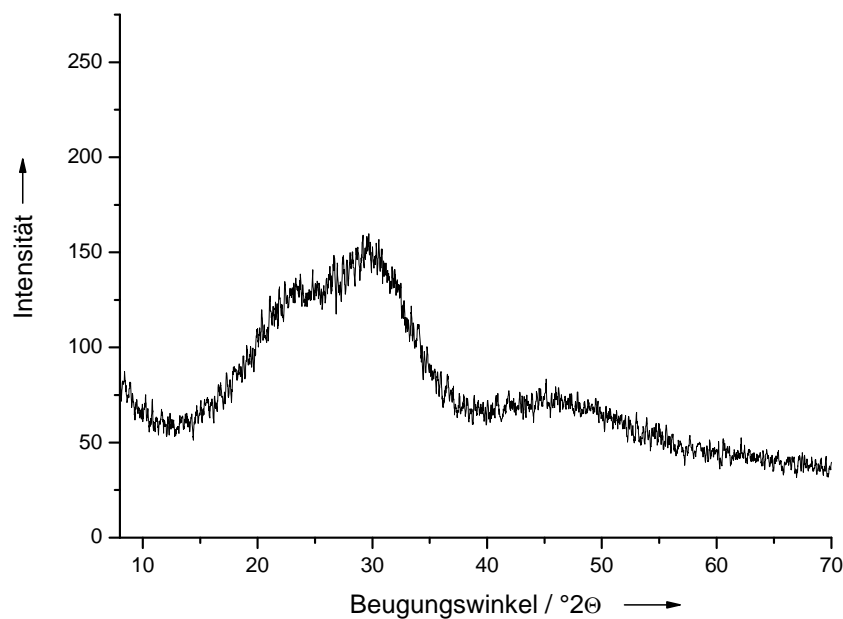


Abbildung 31: Diffraktogramm von lyophilisierten Kolloiden; es sind auch nach 4 Wochen keine Reflexe erkennbar, dies ist ein Hinweis auf die Bildung einer stabilen amorphen Phase von Calciumphosphat.

Betrachtet man das Diffraktogramm von lyophilisierten Partikeln (Abbildung 31), so stellt man fest, dass diese amorph sind. Dieser Zustand ändert sich auch bei längerer Lagerung nicht. Die Abbildung 31 zeigt ein Diffraktogramm von vier Wochen alten lyophilisierten Kolloiden (24 h Haupttrocknung, 24 h Nachtrocknung). Die Kolloide wurden nach der Trocknung bei Raumtemperatur im Schnappdeckelglas gelagert. Offensichtlich sind die Kolloide in dieser Zeit nicht kristallisiert. Die Gefriertrocknung bietet damit die Möglichkeit, amorphes Calciumphosphat in nanopartikulärer Form zu synthetisieren. Die Haltbarkeit dieser Phase ist in dem beobachteten Untersuchungszeitraum ebenfalls gegeben. Eine Untersuchung über einen längeren Beobachtungszeitraum bietet sich für die Zukunft an, um weitere Ergebnisse zur Lagerfähigkeit der Partikel zu gewinnen. Da sich im Abstand von vier Wochen allerdings keinerlei Änderungen in der Kristallinität zeigten, ist in hohem Maße davon auszugehen, dass dieser amorphe Zustand sich auch über einen längeren Zeitraum nicht ändert.

3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse von den verschiedenen Trocknungsmethoden

Eine Übersicht der Ergebnisse der verschiedenen Trocknungsmethoden ist in Abbildung 32 als Flussdiagramm dargestellt. Nach der Fällung der Nanopartikel verzweigt sich das Diagramm in die oberflächenfunktionalisierten und die nicht funktionalisierten Kolloide. Danach erfolgte für alle Partikel die Waschung mit Reinstwasser. Identisch sind dann die drei verschiedenen Methoden zur Trocknung. Erstens mit Alkohol, als zusätzlicher Waschschrift vor der dann erfolgten Trocknung bei 37 °C, zweitens das Einfrieren für die Lyophilisation und drittens die Trocknung ohne weitere Behandlung. Die Partikel, die nur mit Wasser gewaschen wurden, sind kristallin und nicht wieder in Dispersion zu bringen. Alle anderen Methoden führen zu redispergierbaren Kolloiden, die entweder amorph sind (nach der Lyophilisation) oder nanokristallin (nach Waschen mit 2-Propanol). Die Dispergierbarkeit der funktionalisierten Partikel war immer allgemeinen besser möglich als bei den nicht funktionalisierten Partikeln.

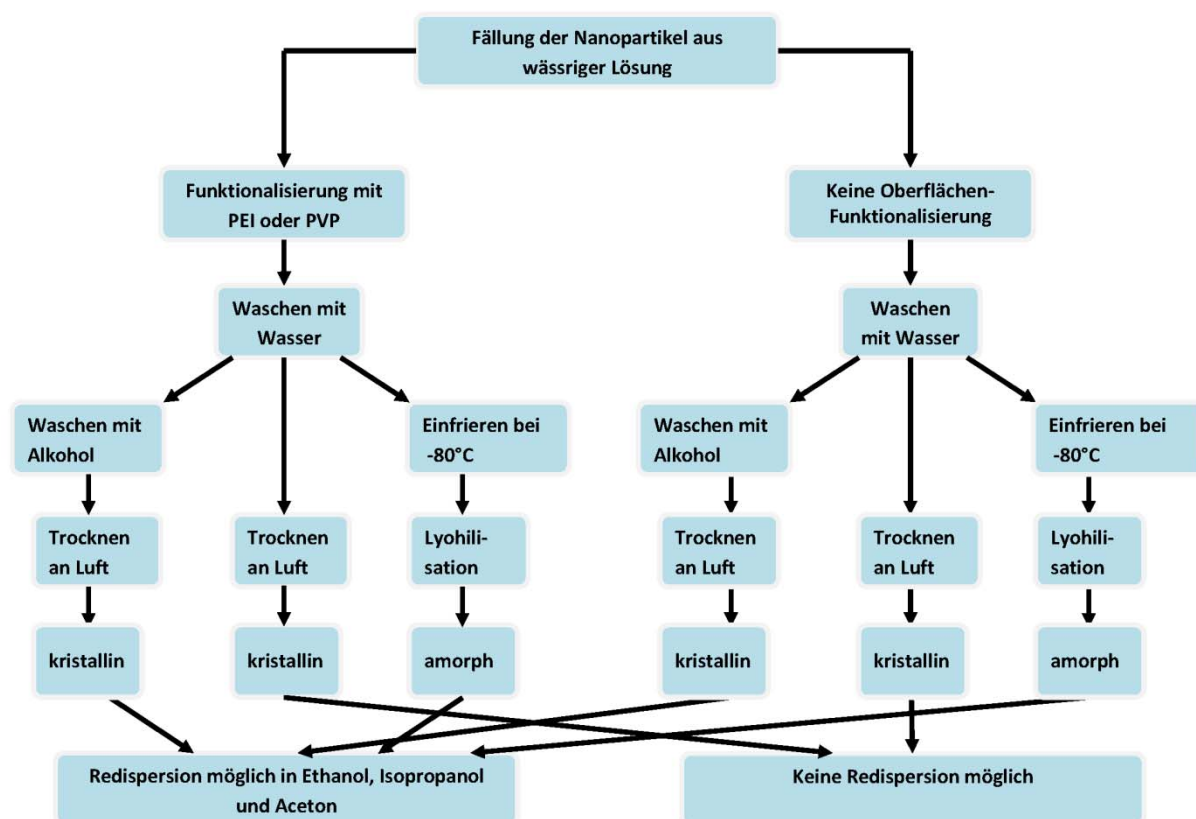


Abbildung 32: Darstellung der Ergebnisse der unterschiedlichen Trocknungsmethoden als Flussdiagramm.

Zur weiteren Analyse wurden die Kolloide IR-spektroskopisch untersucht. Die IR-Spektren ergeben, dass die Partikel nach der Trocknung einen geringen Anteil an Carbonat enthalten. Dies ergibt sich aus der Reaktion von atmosphärischem CO_2 mit der basischen Reaktionslösung. Die breite Bande bei 868 cm^{-1} tritt nie in gut kristallisierten Apatiten auf, sondern nur in Apatiten mit geringer Kristallinität wie z.B. Knochenmineral und Dentin [153]. Ein weiterer Beweis für nanokristallines Material sind die verbreiterten Banden bei 570 cm^{-1} (P-O Streckschwingung ν_4) und 1050 cm^{-1} (P-O Streckschwingung ν_3). Der verbreiterte Peak bei 1659 cm^{-1} stammt aus der H-O-H Rotationsschwingung von freiem Wasser im Material. Ein weiterer Beleg für die Präsenz von Carbonat in den Kolloiden, fand sich bei den Untersuchungen im HRTEM. Die Ergebnisse dazu finden sich in Kapitel 3.3.5.

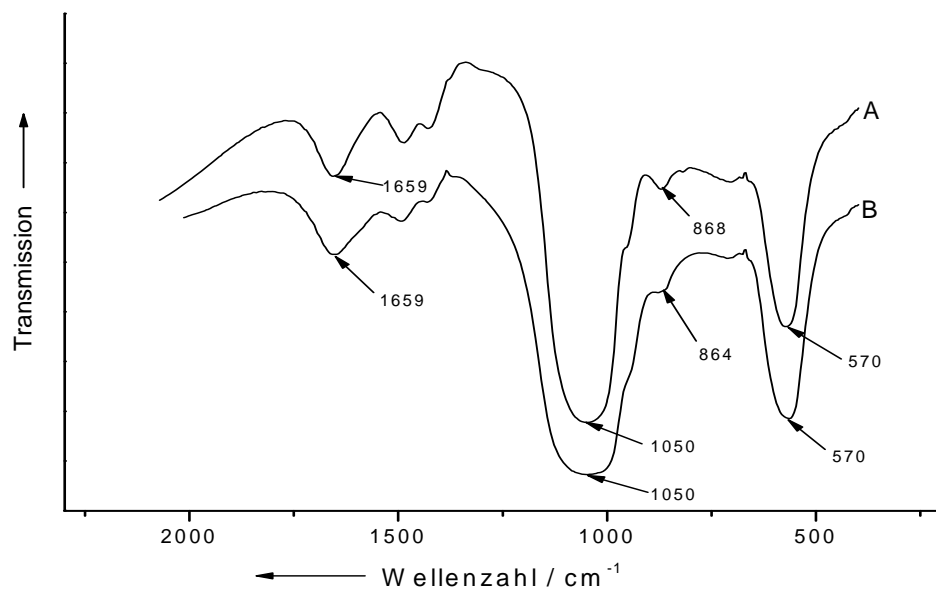


Abbildung 33: IR-Spektrum von lyophilisierten Kolloiden (B) und mit 2-Propanol gewaschenen und an Luft getrockneten Kolloiden (A). Die breiteren Banden von B sprechen für einen weniger kristallinen Zustand der Partikel.

3.3.5 HRTEM Untersuchungen zur Aufklärung der internen Struktur und Zusammensetzung der Calciumphosphat-Nanopartikel

Die Untersuchungsmethoden Röntgenbeugung und Elementaranalyse sind im Grunde Methoden, um Aufklärung über die makroskopisch ausgedehnte Phase der Nanopartikel zu liefern. Wenn die Probe nicht phasenrein ist und die Kristalldomänen zu klein sind, um bestimmt zu werden [158], so ist es schwierig, etwas über die Phasenzusammensetzung zu sagen. Die Untersuchung im hochauflösenden Transmissionselektronenmikroskop bot die Möglichkeit, etwas über das Nanopartikel an sich herauszufinden, unter der Prämisse, dass alle Partikel der Probe zumindest sehr ähnlich oder gleich waren. Wirklich identische Nanopartikel gibt es bei einigen definierten Beispielen, wie dem Au_{55} -Cluster [159-161].

Die Auflösung von unter einem Nanometer ergab äußerst detaillierte Daten über Zusammensetzung (durch EDX), Kristallinität (durch Beugung) und Morphologie der Calciumphosphat Nanopartikel. Hauptsächlich aus Zeitgründen ließen sich immer nur wenige Bereiche der Probe im HRTEM analysieren. Da aber Übersichtsaufnahmen im REM eine einheitliche Morphologie der Kolloide gezeigt haben, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass die im HRTEM gewonnenen Ergebnisse repräsentativ für die gesamte Probe waren. Die durch Jäger et al. gezeigten Daten [162], die über Festkörper-NMR Untersuchungen bestimmt wurden, sagten aus, dass nanokristalline Calciumphosphatpartikel aus einem hydroxylapatitischen Kern und einer hydratisierten Schale aus Octacalciumphosphat bestehen. Die Untersuchungen im HRTEM fanden an Partikeln statt, die noch ähnlich synthetisiert wurden. Der Unterschied zwischen beiden Ausgangsmaterialien lag in der Trocknung. Die NMR-Daten wurden an Proben gewonnen, die ohne Waschen an Luft getrocknet wurden und damit auch über kristalline Brücken zwischen den Partikeln vernetzt waren [153]. Mit dem Vergleich zwischen funktionalisierten und unfunktionalisierten Partikeln sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen der internen Kristallinität und der Funktionalisierung gefunden werden. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Trocknungsmethoden sollte Aufklärung über die unterschiedliche Dispergierbarkeit und Kristallinität nach dem Trocknen liefern. Die Kontrolle über die Kristallinität der Partikel liefert die Kontrolle über die biologische Abbaubarkeit. Diese hängt stark von der internen Kristallinität der Partikel ab

[163-165]. Es wurden mehrere Proben mit unterschiedlicher Funktionalisierung und Trocknung untersucht. Dies diente dazu herauszufinden, inwieweit die Trocknungsmethode Einfluss auf die interne Struktur der Partikel hat. Eine Änderung in der Morphologie der Partikel konnte im REM nicht beobachtet werden. Weiterhin wurden Proben untersucht, die nach ihrer Fällung nicht getrocknet, sondern 180 Tage unter 2-Propanol aufbewahrt wurden (Abbildung 34).

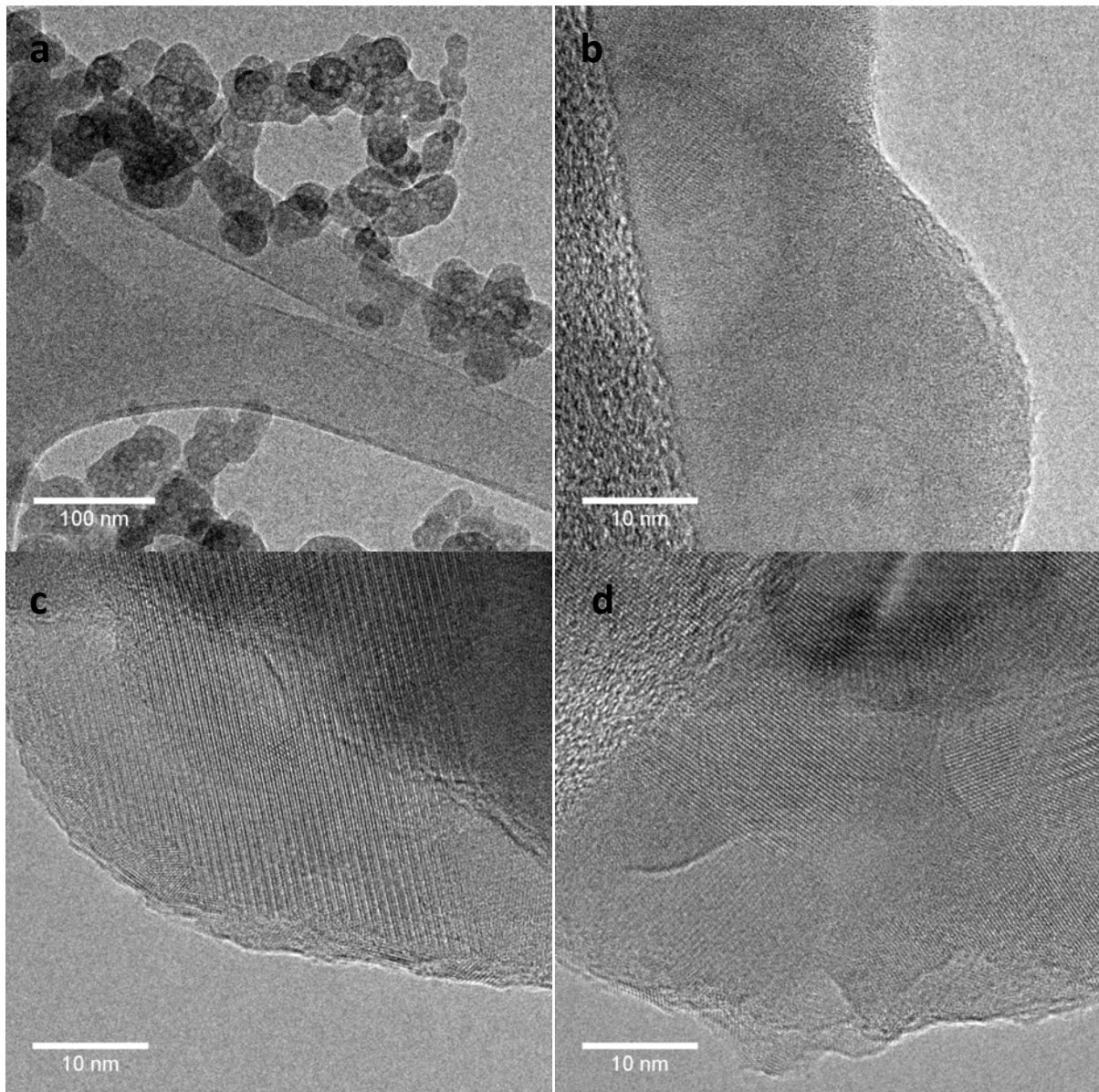


Abbildung 34: HRTEM-Aufnahmen von PVP-funktionalisierten Kolloiden nach Waschung mit 2-Propanol und Trocknung an Luft im Trockenschrank bei 37 °C.

Die Ergebnisse der PVP-funktionalisierten Kolloide, die mit 2-Propanol gewaschen wurden (fünfmal) und anschließend bei 37 °C im Trockenschrank für drei Tage getrocknet wurden, sind in Abbildung **34** gezeigt. Die Übersichtsaufnahme in **34a** bestätigt die Größenverteilung der Partikel aus den REM-Aufnahmen im Bereich von 50-80 nm. Die 400000-fachen Vergrößerungen in **34c** und **34d** zeigen die kristalline interne Struktur der Kolloide. Interessant ist hier der Unterschied zwischen manchen Partikeln, die sowohl einkristallin (**34c**), als auch polykristallin (**34d**) vorliegen können. Die „blasenartigen“ Strukturen, die man in **34a** und **34b** erkennen kann, verschwinden bei höherer Vergrößerung. Sie sind Artefakte des Elektronenstrahls, welcher mit der Probe wechselwirkt und so dieses nicht reale Bild erzeugt. Lokale EDX-Messungen ergaben ein Ca/P-Verhältnis von 1,67. Die Elektronenbeugung ergab ebenfalls die für Hydroxylapatit typischen Reflexe. Der Partikelrand erscheint nicht glatt, sondern eher rau und uneben. Die kristallinen Bereiche haben hier einen anderen Gitterabstand und die Fourier-Transformation der Beugung liefert den Nachweis von Calciumoxid mit den typischen Signalen (200) und (002) von Hydroxylapatit. Es ist bei diesen Aufnahmen aber noch zu beachten, dass dort die Partikel teilweise noch übereinander liegen (**35c**) und so eine polykristalline Struktur vortäuschen können.

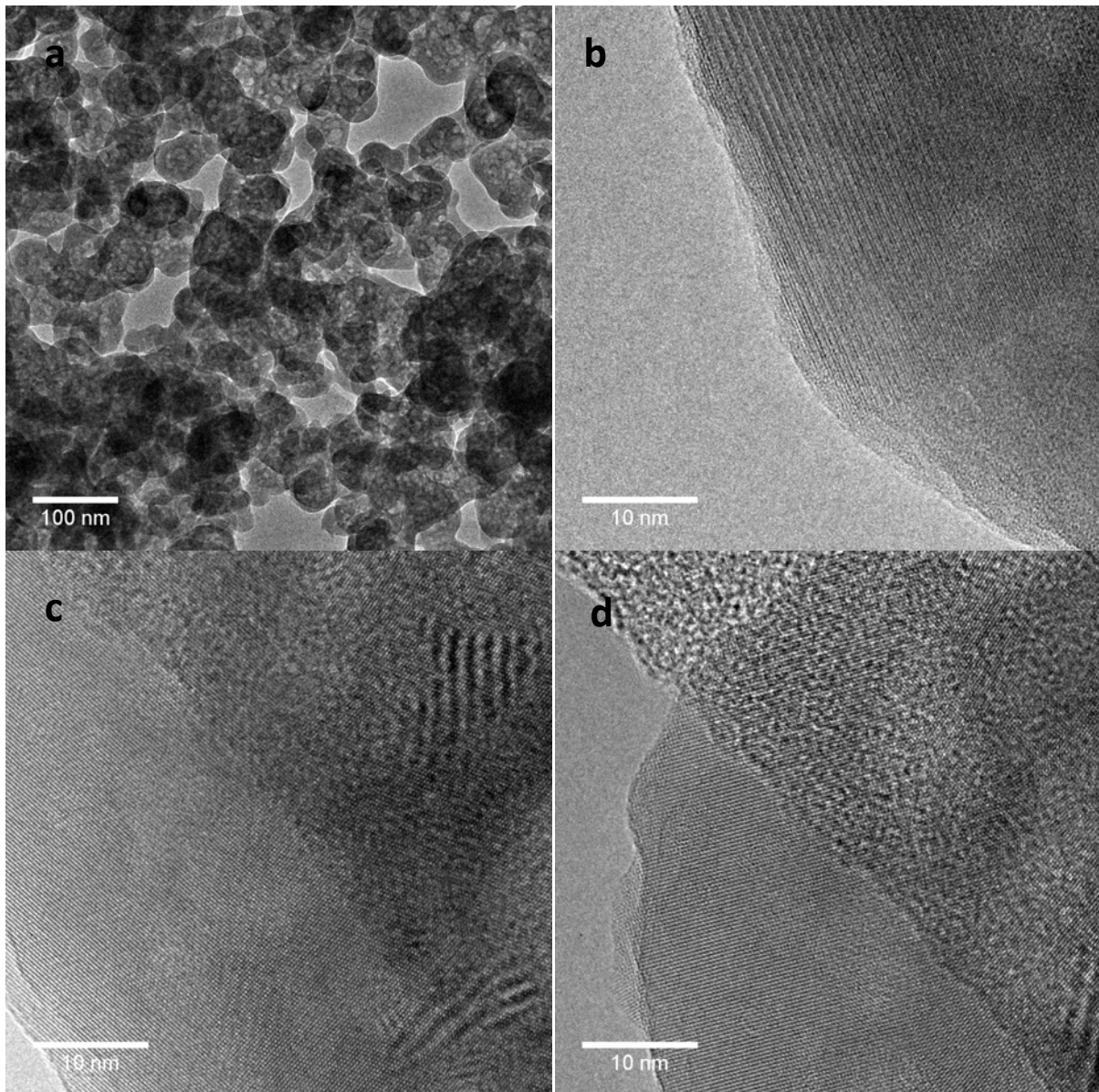


Abbildung 35: HRTEM-Aufnahmen von PVP-funktionalisierten Partikeln nach 180 Tagen Lagerung in 2-Propanol.

Die HRTEM-Untersuchungen, die in Abbildung 35 dargestellt sind, wurden an PVP-funktionalisierten Partikeln durchgeführt, die nicht getrocknet, sondern für 180 Tage in 2-Propanol gelagert wurden. Die Kolloide wurden dazu mit 2-Propanol gewaschen und dann in 2-Propanol suspendiert. Eine geringe Menge an Wasser enthielten sie somit noch immer. Es hätte somit noch eine Ostwaldreifung der Partikel stattfinden können.

Im Vergleich mit der vorhergehenden Abbildung von getrockneten Kolloiden fällt auf, dass es keinen Unterschied gibt. Die Morphologie und Größenverteilung in den Übersichtsaufnahmen (34a und 35a) sind nahezu identisch, die interne Kristallstruktur der Partikel zeigt ebenfalls Hydroxylapatit

(bestimmt durch EDX und FT-Analyse). Es treten auch hier Partikel auf, die einkristallin sind (**36b**), oder auch aus polykristallinen Bereichen bestehen können (**36c**).

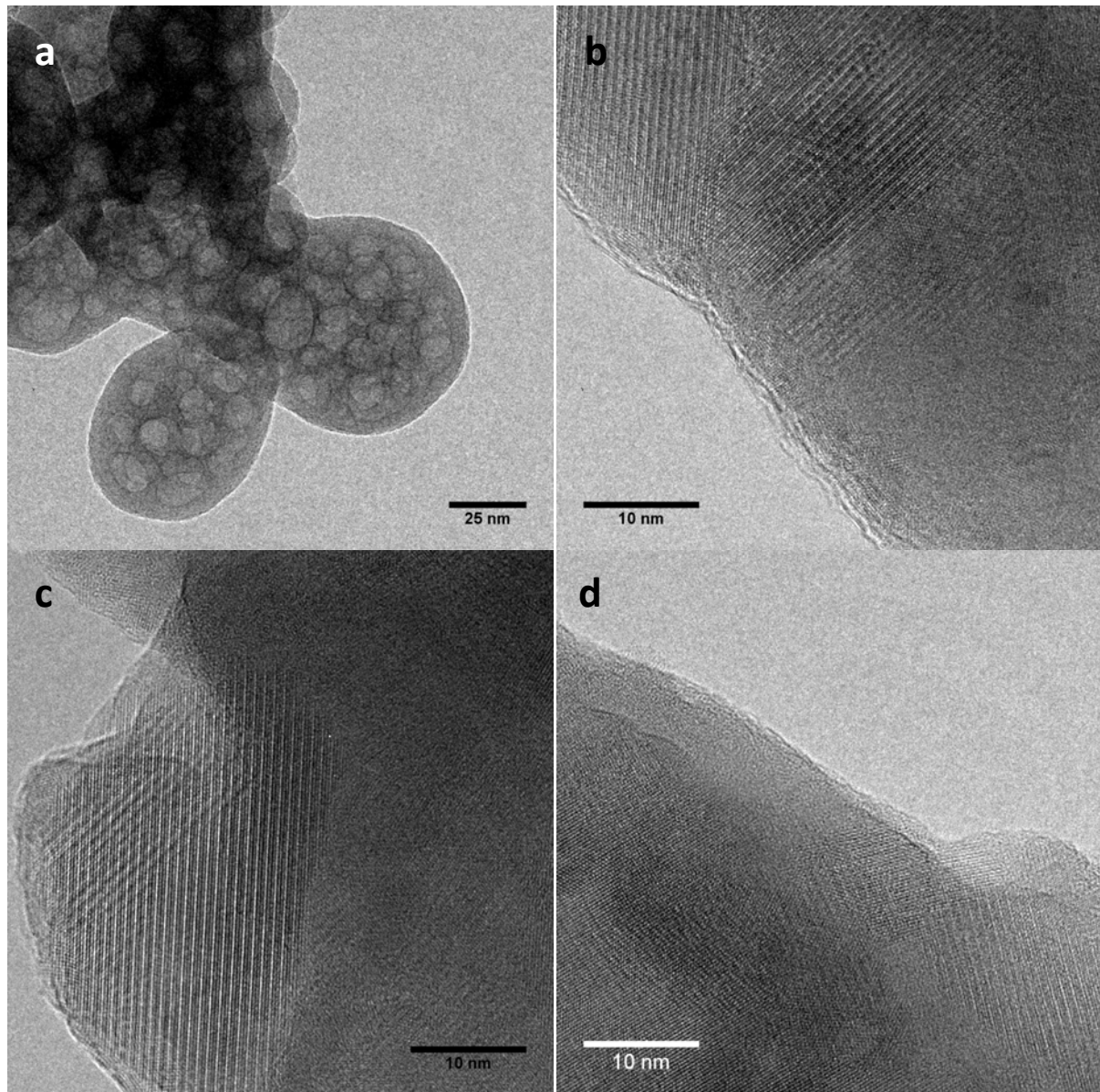


Abbildung 36: HRTEM-Aufnahmen von PEI-funktionalisierten Nanopartikeln nach Waschung mit 2-Propanol und Trocknung an Luft.

Weiterhin wurden PEI(750 kDa)-funktionalisierte Kolloide untersucht. Auch hier finden sich keinerlei Unterschiede zu den vorhergehenden Untersuchungen (Abbildung 35). Abbildung 36a zeigt einige Partikel, bei denen wieder das Interferenzmuster mit dem Elektronenstrahl auftritt. Bei höherer Vergrößerung verschwinden diese lochartigen Strukturen. An deren Stelle tritt wieder das typische Bild der Netzebenenscharen von Hydroxylapatit. Dass der Rand des Partikels wieder eine andere Kristallinität aufweist, zeigt sich in Abbildung 36b

sehr gut. Die Partikelränder sind uneben und weisen andere Orientierungen der Netzebenen auf. Die verschiedenen Polymere zur Funktionalisierung haben offensichtlich keinen Einfluss auf die Morphologie der Partikel und deren internen Zusammensetzung. Das Partikelinnere besteht in allen Fällen aus Hydroxylapatit, der Rand aus Calciumoxid. Eine Erklärung für die Gegenwart von Calciumoxid wird in Kapitel **3.3.6** behandelt.

Im scharfen Kontrast zu diesen Ergebnissen stehen die Daten der lyophilisierten Partikel (Abbildung **37**). Während die Übersichtsaufnahme in **37a** noch die Größenverteilung bestätigt, ist selbst bei höchster Vergrößerung keinerlei kristalline Struktur erkennbar. Alle Partikel sind völlig amorph. Die Ränder der Partikel sind etwas glatter und unterscheiden sich ebenfalls nicht vom Inneren der Partikel. EDX-Analysen ergaben ein Ca/P-Verhältnis von 1,66 bis 1,74. Dies entspricht ziemlich genau dem Verhältnis von Hydroxylapatit. Offensichtlich ist die Zusammensetzung des Partikels eine amorphe Phase des Calciumphosphats.

Die Kristallisation der Kolloide erfolgt beim Trocknungsprozess, bei oder über Raumtemperatur. Die kristallinen Proben wurden alle mit Wasser und 2-Propanol gewaschen und bei 37°C an Luft im Trockenschrank gelagert. XRD-Daten zeigen für diese Partikel auch verbreiterte Peaks bei den für Hydroxylapatit typischen Reflexen. Eine Bestimmung des Wassergehalts von solch lyophilisierten Partikel wurde mit Hilfe der Thermogravimetrie vorgenommen. Die Partikel enthalten je nach Dauer der Lyophilisation zwischen 12 % (48 h Trocknung) und 25 % (24 h Trocknung) Wasser. Dieses interpartikuläre Wasser führt offenbar nicht zu einer Kristallisation der Partikel, ersichtlich an der Tatsache, dass die untersuchten Kolloide nach dem Trocknungsprozess mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert wurden. Würde dieses Wasser Diffusionsprozesse erlauben, so hätte sich das thermodynamische Gleichgewicht eingestellt, und die Partikel wären kristalliner geworden.

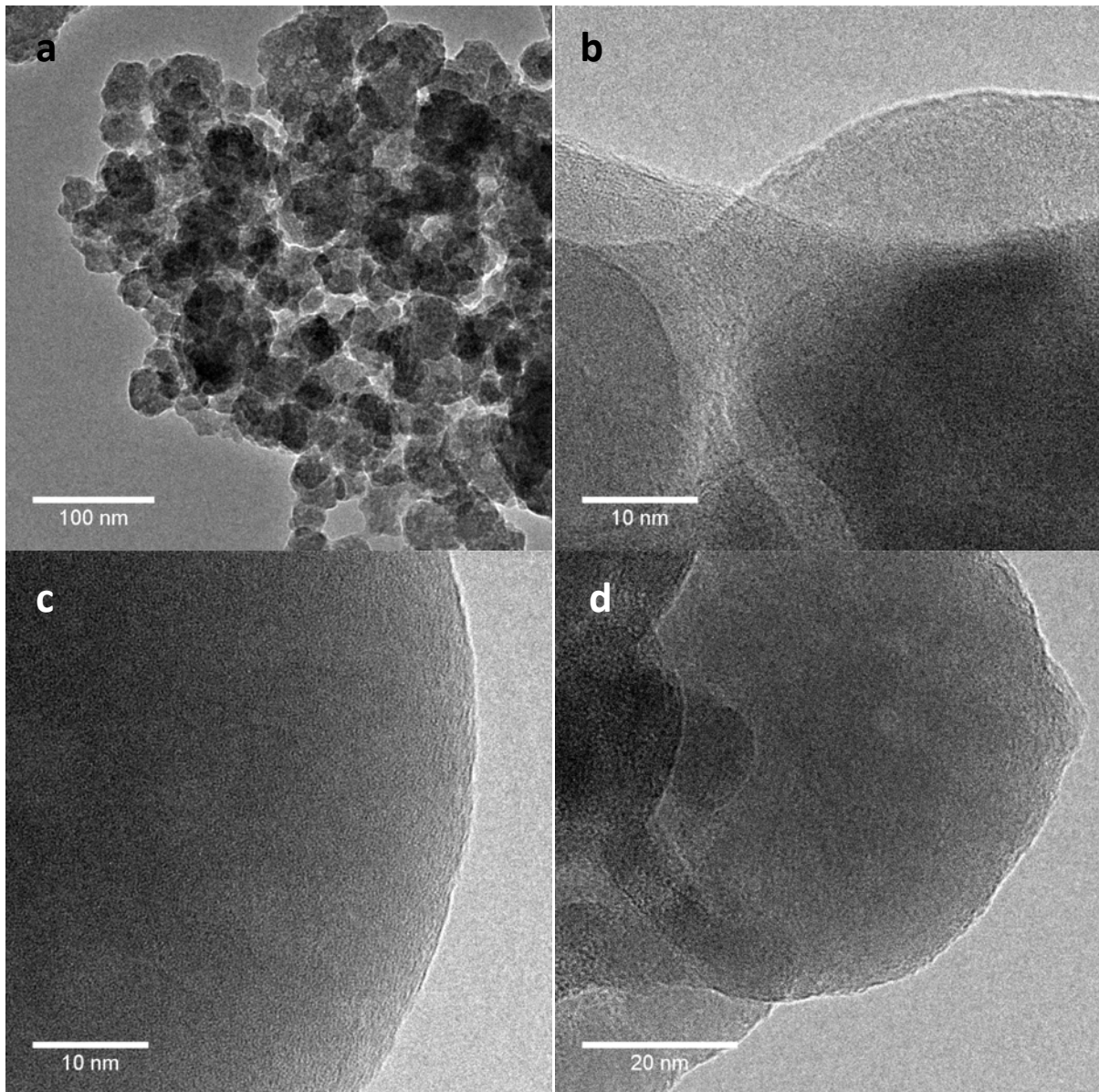


Abbildung 37: HRTEM-Aufnahmen von PEI-funktionalisierten Kolloiden nach der Lyophilisation. Alle Partikel sind amorph.

Die HRTEM-Aufnahmen in Abbildung 36 zeigen auch, dass es sich bei hier dargestellten Kolloiden wirklich um die Primärpartikel handelt, die dann später die Agglomerate bilden. Wären die Partikel selbst aus noch kleineren Partikeln aufgebaut, wie die polykristallinen Partikeln nach der Trocknung an Luft vermuten ließen, so müssten sich solche Partikel in diesen Aufnahmen finden lassen. Eine ähnliche Untersuchung wurde von Suvurova et al. durchgeführt, um bei einer Präzipitation aus wässriger Lösung die Grenzschicht zwischen Hydroxylapatit und Octacalciumphosphat zu studieren [166].

In die HRTEM-Aufnahme in Abbildung 38 wurde der Gitterebenenabstand (rote Pfeile) eingefügt. Zusammen mit dem eingefügten FT-Beugungsbild beweist dies die innere Zusammensetzung der Partikel: Beides spricht für eine Phase aus Hydroxylapatit. Der Rand der Partikel weist auch hier eine andere Zusammensetzung auf. Ein Beweis für die von der Funktionalisierung der Partikel unabhängigen Struktur.

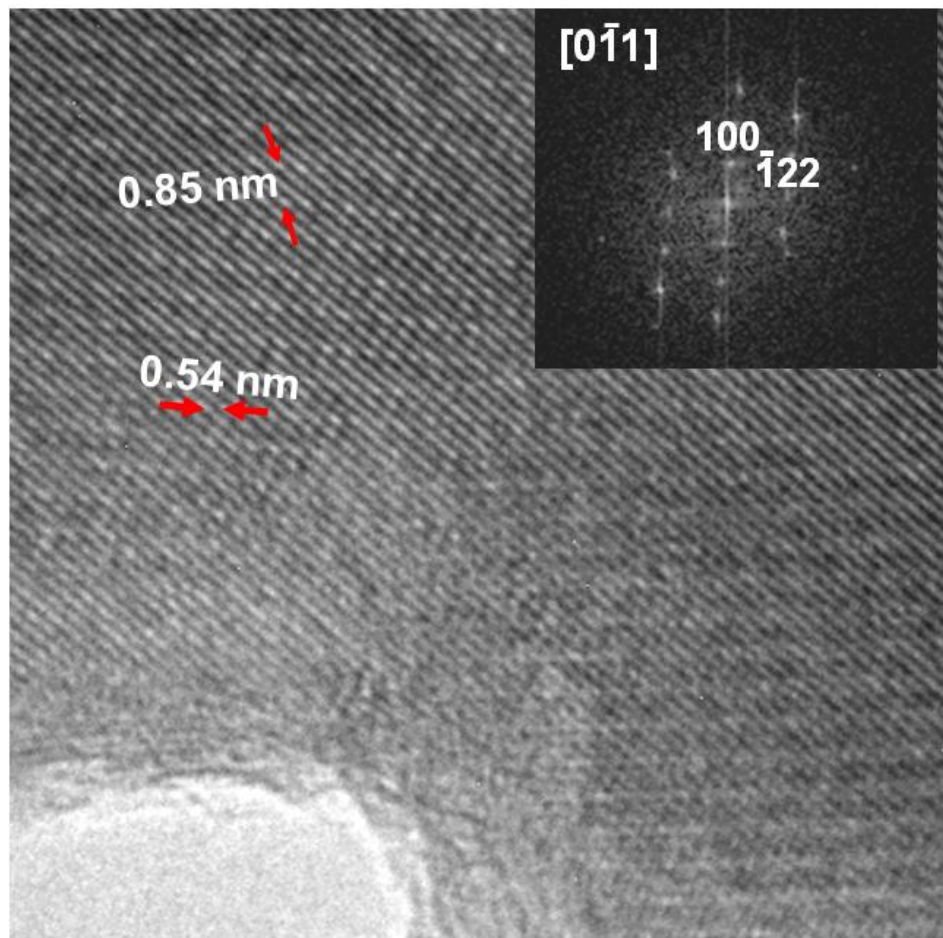


Abbildung 38: HRTEM-Aufnahme eines unfunktionalisierten Nanopartikels (gewaschen mit 2-Propanol und getrocknet bei 37 °C an Luft im Trockenschrank). Die Gitterabstände und das Beugungsbild bestätigen eine Apatit-Struktur.

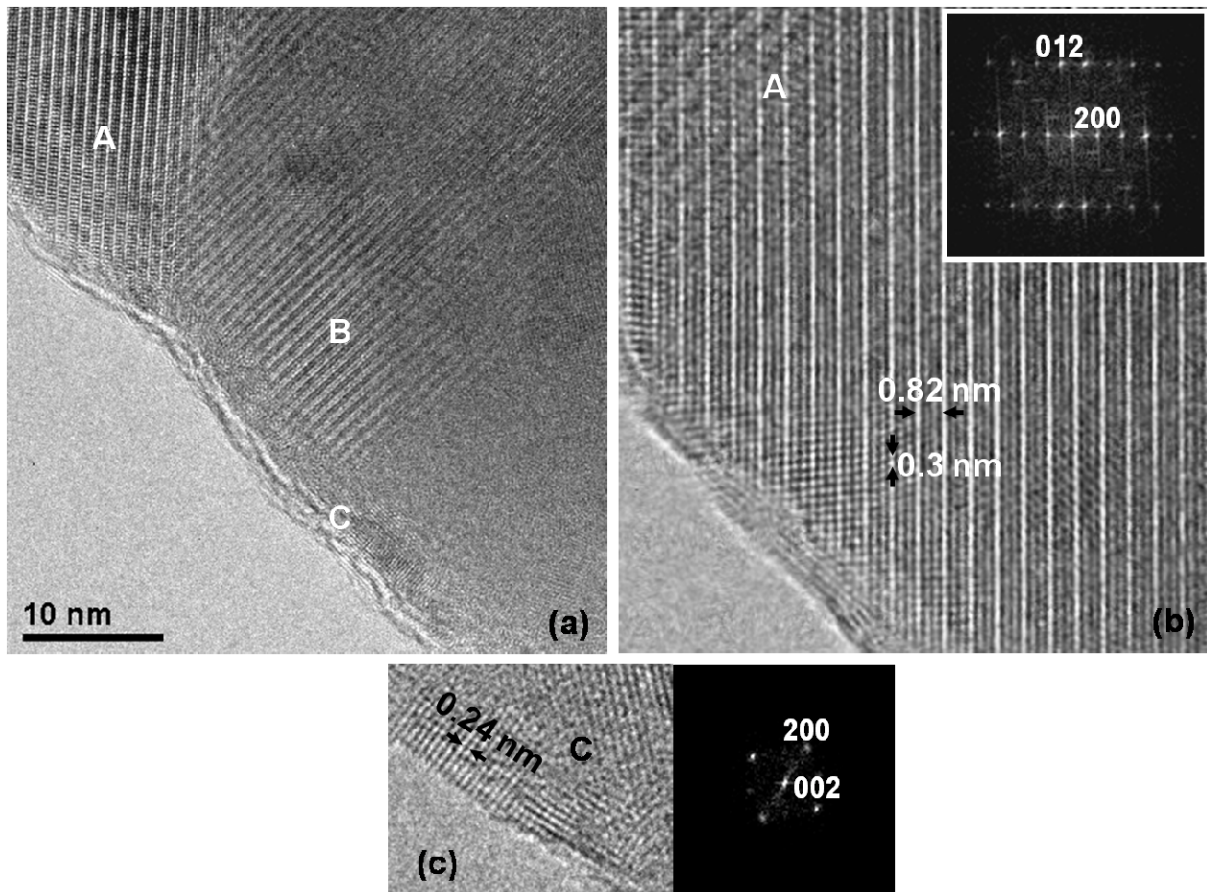


Abbildung 39: HRTEM-Aufnahme eines PVP-funktionalisierten Partikels (gewaschen mit 2-Propanol und getrocknet bei 37 °C an Luft im Trockenschrank). Die innere Kristalldomäne (b) ist Hydroxylapatit, die des Randes (c) Calciumoxid.

In Abbildung 39a ist noch einmal ein Ausschnitt eines mit PVP-funktionalisierten Partikels dargestellt. Der Bereich der Domäne A ist in Bild 39b vergrößert abgebildet. Die Netzebenen und ein FT-Beugungsbild sind eingebettet und beweisen die Existenz von Hydroxylapatit. Der Bereich C ist in 39c vergrößert dargestellt. In dieser Abbildung wird auch noch einmal der Übergang von der apatitischen Domäne zu der Randdomäne deutlich. Hier beträgt der Abstand der Netzebenen 2,4 Å, und das FT-Beugungsbild spricht für die Gegenwart von Calciumoxid. Die Frage, die sich nun stellt, ist die des Zustandekommens einer Randschicht aus Calciumoxid. Die Reaktionsbedingungen der Synthese begünstigten keinesfalls eine Fällung von Calciumhydroxid, welches sich dann im Elektronenstrahl unter H₂O Abgabe zu CaO zersetzen könnte. Eine Erklärung findet sich bei näherer Betrachtung in der hydratisierten Aussenschicht des Kolloids nach der Synthese [153]. In diese Schicht kann CO₂ aus der Luft eindiffundieren und mit den dort befindlichen OH⁻-Ionen Calciumcarbonat bilden. Dieses wiederum wird unter CO₂-Abgabe im

Elektronenstrahl zum Calciumoxid zersetzt. Bei der Annahme einer Schichtdicke von etwa 1 nm, würde dies für ein 80 nm Teilchen einen Volumenanteil von etwa 7 % bedeuten. Thermogravimetrische Messungen ergaben allerdings nur einen Masseverlust durch CO_2 von etwa 1 %. Dies wiederum entspricht einem CaCO_3 Anteil von etwa 3 %. Da die Oxidschicht am Rand aber nur maximal 1 nm dick ist und an vielen Stellen dünner, könnten diese Resultate dennoch übereinstimmen.

Abbildung 40 zeigt die Ergebnisse der lokalen Elementbestimmung im Partikel durch EDX. Das Partikelinnere besteht aus Hydroxylapatit mit dem typischen Ca/P-Verhältnis von 1,7. Dieses steigt zum Rand hin auf vier an, ein Anzeichen für den zunehmenden Carbonatgehalt und den sinkenden Phosphatanteil. Da es nicht möglich ist, frische, feuchte Partikel mit intakter hydratisierten Aussenschicht im HRTEM zu untersuchen, lässt sich keine Aussage zur Dicke dieser Schicht im neugebildeten Kolloid treffen. Die hier gefundene Schicht konnte erst untersucht werden, nachdem ihre primäre Struktur bereits durch die Trocknung kollabiert war. Interessant wäre in Zukunft die Untersuchung solcher hydratisierten Schichten von Nanopartikeln. Da es mittlerweile bereits möglich ist, im REM unter feuchten Bedingungen zu arbeiten [167], ist es nur eine Frage der Zeit, bis der technische Entwicklungsstand an einer solchen TEM-Variante angelangt ist. Gai beschrieb bereits 2002 die Entwicklung eines TEM, das unter feuchten Bedingungen arbeiten kann [168]. Oleshko et al. beschrieben eine Ziegler-Natta-Katalyse mit Hilfe eines unter atmosphärischen Bedingungen arbeitenden, modifizierten TEM ebenfalls 2002 [169].

Da die Polymerbeschichtung der Kolloide nur sehr dünn war, konnte diese in den Aufnahmen am HRTEM nicht sichtbar gemacht werden. Es lässt sich somit keine Aussage zu einer Schichtdicke der Funktionalisierung machen. Weiterhin lässt sich aber ausschließen, dass durch den Herstellungsprozess Polymer in den Partikeln eingeschlossen wurde; Kavitäten oder ähnliches ist in den Aufnahmen nicht zu finden.

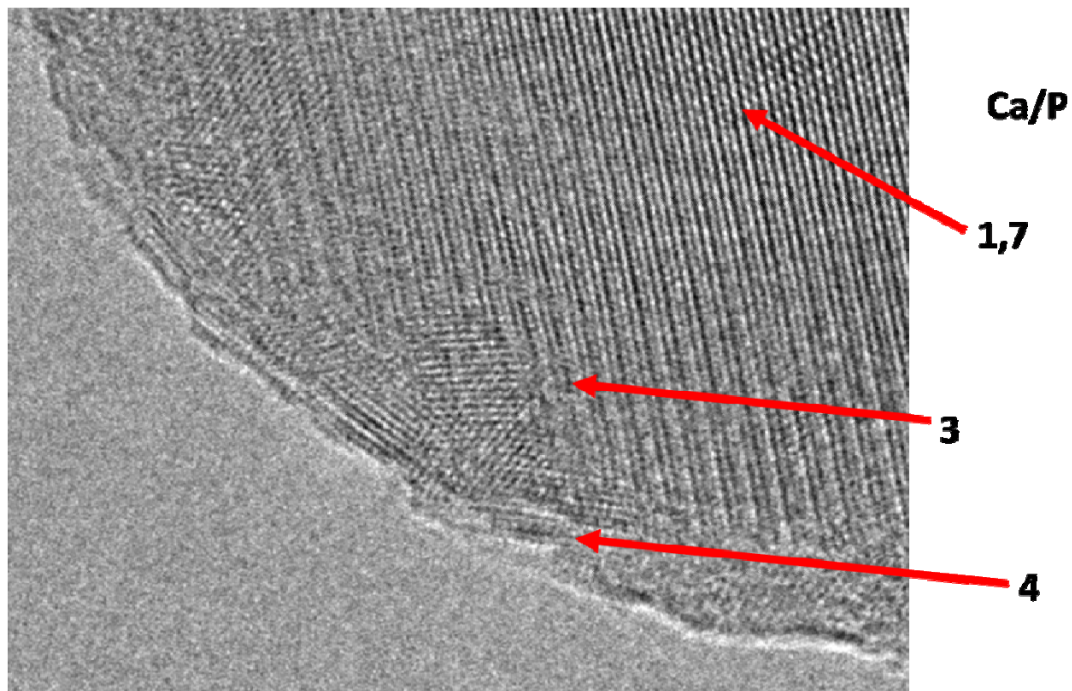


Abbildung 40: HRTEM-Aufnahme des Partikelrandes eines mit PVP-funktionalisierten Kolloids mit eingezeichneten Positionen der lokalen EDX-Elementbestimmung. Das Ca/P-Verhältnis steigt zum Rand hin stark an.

Eine ungeklärte Frage blieb zu dem Zeitpunkt, an dem die Kolloide letztendlich vom amorphen Zustand in einen nanokristallinen Zustand übergehen. Die direkt nach der Synthese bei -80 °C eingefrorenen und dann lyophilisierten Partikel waren amorph und blieben dies auch in dem beobachteten Zeitraum von vier Monaten. Wurden die Partikel noch auf dem Filter mit Alkohol gewaschen und anschließend bei 37 °C im Trockenschrank gelagert, waren nach 24 h im XRD bereits die breiten Hydroxylapatit-Signale erkennbar. Eine Möglichkeit zur Aufklärung dieser Frage bot eine DSC-Untersuchung von eingefrorenen Partikeln. Es wurden dazu einige Milligramm feuchte Kolloide im DSC-Tiegel eingefroren und einem Temperaturprogramm unterworfen. Im Temperaturbereich von -20 bis 600 °C wurde ein exothermes Signal erwartet, wenn die Gitterenergie bei der Kristallisation der amorphen Kolloide frei wird. Außer zwei stark endothermen Signalen bei 0 und 100 °C war aber nur bei den funktionalisierten Kolloiden ein exothermes Signal zu finden. Dieses Signal beinhaltete die Zersetzung des Polymers. Anscheinend ist der Prozess, der zur Bildung der nanokristallinen Phase führt, komplexer als es den Anschein hat. Hier sind weitere Untersuchungen nötig, um diesen interessanten Aspekt der Kolloide näher zu beleuchten.

3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsmethoden

Die Ergebnisse der verschiedenen Charakterisierungsmethoden ergaben ein vielfältiges Bild der Synthesemöglichkeiten der Nanopartikel. Mit der dynamischen Lichtstreuung ließen sich die Zetapotentiale bei den Funktionalisierungsexperimenten bestimmen, sofern das verwendete Polymer kationisch oder anionisch war. Die DLS stieß an ihre Grenzen, als ungeladene Polymere wie PVP verwendet wurden. Ohne Ladung ließen sich weder ein Zeta-Potential, (wegen der fehlenden Ladung) noch eine Größenverteilung (aufgrund der hohen Agglomeration) bestimmen. Die erste Aussage, die sich bei einer DLS Untersuchung treffen ließ, war die, ob eine Dispersion vorlag. War die Dispersität der Lösung schlecht, so ließen sich keinerlei Aussagen zu Größe und Ladung eines Nanopartikels treffen.

Das REM lieferte ebenfalls keinen Hinweis auf die Funktionalisierung. Hier ergaben die Aufnahmen der verschiedenen Synthesen (1-stufig, 2-stufig, Rohrreaktor) ein identisches Bild der Morphologien. Unterschiede fanden sich auf den Aufnahmen der verschiedenen Trocknungsmethoden. Ohne Waschung mit organischen Lösungsmitteln war die Struktur des Materials sehr kompakt. Hieraus konnte dann auch das schlechte Ergebnis bei den Versuchen zur Redispergierung erklärt werden. Die schematische Darstellung in Abbildung 41 zeigt den Ablauf der Bildung von interpartikulären Brücken bei der Trocknung und Reifung der Partikel. Die hydratisierten Oberflächen der Partikel liegen nach der Filtration aneinander. Im Falle der weiteren Lagerung in Wasser tauschen sich Ionen aus der Lösung mit der Schicht aus. Das Calciumphosphat kristallisiert aus und verbindet die Nanopartikel zu größeren Kristalliten. Falls die Partikel getrocknet werden und das interpartikuläre Wasser nicht zuvor entfernt wurde, führt dies unweigerlich zu einer Verfestigung der hydratisierten Schicht und die Partikel aggregieren irreversibel (Abbildung 41).

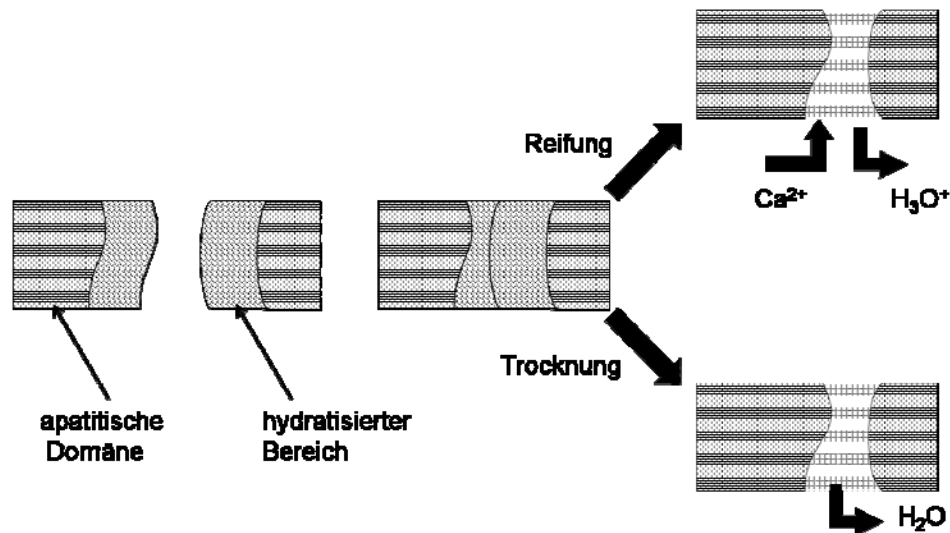


Abbildung 41: Schematische Darstellung der hydratisierten Aussenschicht der Partikel und die Verbrückung bei Trocknung und Reifung.

Die IR-spektroskopischen Daten ergeben, dass die Kolloide nanokristallin sind, erkennbar an den verbreiterten Banden (Kapitel 3.3.4). Die lyophilisierten Kolloide haben noch breitere Banden, was auf eine amorphe Struktur schließen lässt. Ebenfalls finden sich die charakteristischen Banden für einen kleinen Anteil an Carbonat im Kolloid. Die Banden des Polymers sind nicht sichtbar, da der Anteil der Polymere an den Partikeln bei 1-2 % liegt. Die Wasserbande ist ebenfalls groß und deutet auf einen, nach der Trocknung immer noch hohen, Wasseranteil hin.

Durch die thermogravimetrischen Analysen ließ sich der Wasseranteil in den Partikeln bestimmen (Temperaturprofil von 35-1000 °C, Heizrate 3 K min⁻¹). Die mit Alkohol gewaschenen Partikel wiesen nach der Trocknung immer noch einen Wasseranteil von 12-15 % auf. Der Wassergehalt der lyophilisierten Kolloide konnte durch 48 Stunden Trocknung auf 10 % gesenkt werden. Ebenso konnte der geringe Anteil an Carbonat bestimmt werden. Ein CO₂-Verlust von 1 % entspricht 2,3 % Calciumcarbonat in der Probe. Da der Wasserverlust über einen größeren Temperaturbereich ablief, konnte der Gehalt an Polymer durch die Thermogravimetrie nicht bestimmt werden. Die Zersetzung des Polymers lief im selben Bereich ab wie der Wasserverlust. Ein Herausrechnen dieses Betrags war deshalb unmöglich.

Die Röntgenbeugung ergab für die bei den pH-Werten 7-10 gefällten Kolloide eine Peakverbreiterung bei den für Hydroxylapatit typischen Reflexen. Die Partikel waren nach 24 h nanokristallin, unabhängig von der

Trocknungstemperatur, die bei 37 °C und 75 °C gewählt wurde. Sämtliche Calciumphosphate, die oberhalb eines pH-Werts von 10 gefällt wurden, lieferten nur amorphe Beugungsbilder. Hier fanden sich aber auch im REM keine Nanopartikel mehr, sondern eine flockige Masse ohne definierte Grenzen. Für die gewünschten Nanopartikel mit Hydroxylapatit als Hauptphase wurde deshalb ein pH-Bereich für die Präzipitation von 9,5-10 gewählt. Die Aussagekraft der Beugung bezog sich aber nur auf die kristallinen Phasen der Probe. Eventuell vorhandene amorphe Anteile an Calciumphosphat konnten entsprechend nicht miterfasst werden. Aus diesem Grund wurden die HRTEM-Aufnahmen der Kolloide angefertigt.

In den hoch aufgelösten Aufnahmen des HRTEMs konnte Hydroxylapatit als die dominierende Phase der synthetisierten Kolloide bestimmt werden. In Unabhängigkeit von der Funktionalisierung sind die Morphologie und Kristallinität der Partikel identisch. Gravierende Unterschiede fanden sich in den lyophilisierten Kolloiden. Diese waren völlig amorph, lokale EDX-Analysen ergaben ein Calcium zu Phosphat-Verhältnis von 1,67, was dem Hydroxylapatit entspricht. Der Rand der Kolloide, die an Luft getrocknet wurden, konnte durch FT-Elektronenbeugung und lokale EDX-Analyse als Calciumoxid identifiziert werden. Dieses hatte sich mit hoher Wahrscheinlichkeit im Elektronenstrahl aus dem zersetzten Calciumcarbonat gebildet. Das Calciumcarbonat wiederum war bei der Synthese aus dem Kontakt der hydratisierten Aussenschicht der Kolloide mit CO₂ aus der Umgebungsluft entstanden. Der pH-Wert der Lösungen, bei denen die Fällung erfolgte, lag bei etwa 10. Unter diesen Bedingungen ist die Bildung von Calciumcarbonat aus Ca²⁺-Ionen in der hydratisierten Schicht und atmosphärischem Kohlendioxid nur sehr wahrscheinlich. Um zu verhindern, dass sich Calciumcarbonat bildet, müsste die komplette Synthese unter Schutzgas durchgeführt werden, sowie entgastes Wasser verwendet werden. Es stellt sich dabei die Frage, ob dieser Aufwand die Ergebnisse rechtfertigen würde. Anwendung der Kolloide soll ja biologisch-medizinischer Natur sein. Ein geringer Anteil an Carbonat in den Partikeln sollte die Bioverträglichkeit dieses Materials nicht beeinträchtigen, eher im Gegenteil, weil das natürliche Knochengewebe einen gewissen Anteil an Carbonat enthält [29-31, 165, 170, 171]. Das Material ist somit durch diesen nicht beabsichtigten Effekt näher an sein natürliches Vorbild Knochen gerückt.

Insgesamt lässt sich somit festhalten, dass die entwickelte Route zur Synthese der Calciumphosphat-Nanopartikel eine einfache und reproduzierbare Möglichkeit darstellt, größere Mengen davon herzustellen. Ein System aus vielen gleichgeschalteten Rohrreaktoren könnte eine technische Möglichkeit des „Scale-Up-Prozesses“ darstellen. Je nach gewünschter Anwendung ließen sich uniforme Nanopartikel aus Hydroxylapatit herstellen, die eine nanokristalline innere Struktur haben oder durch eine andere Trocknungsmethode eine amorphe Struktur haben. Eine Lagerung der Kolloide wäre auch in organischen Solventien wie 2-Propanol möglich, ohne dass sich die Kolloide in einem längeren Zeitraum morphologisch oder chemisch verändern würden.

3.4 Elektrophoretische Beschichtungen von Oberflächen

Die Erhöhung der Biokompatibilität von Implantaten durch eine Schicht Hydroxylapatit ist bereits hinreichend bekannt [172-176]. Ein gängiges Verfahren ist heutzutage die Plasmabeschichtung von Titan mit Apatit [177, 178]. Die Vorteile dieses Verfahrens liegen auf der Hand: Die erhaltende Schicht ist mechanisch belastbar und gleichmäßig auf dem Träger aufgebracht. Eine weitere Funktionalisierung, um das Implantat nicht nur biokompatibel, sondern „Bioaktiv“ zu machen, ist mit einem Dip-Coating Prozess möglich [179]. Da ein solches plasmagespritztes Implantat nicht vom Organismus resorbiert werden kann, ist es auch nicht möglich, Wirkstoffe in die Beschichtung einzubringen. Des Weiteren würden auch keine Pharmazeutika den Prozess der Beschichtung unbeschadet überstehen [180-182]. Eine elektrophoretische Beschichtung von polarisierbaren Substanzen lässt sich hingegen schon unter vergleichsweise milden Bedingungen durchführen. Das Verfahren kann bei Raumtemperatur oder darunter durchgeführt werden. Nötig sind dafür Partikel, die eine positive oder negative Oberflächenladung, respektive Oberflächenpotential haben. Die funktionalisierten Nanopartikel weisen eine Ladung auf, die sich über des Zetapotentials definieren lässt. In nichtwässrigen Dispersionen sind hohe Spannungen möglich, die nicht schädlich für die Wirkstoffe sind; weiterhin sollten die Wirkstoffe mit den Solventien nicht reagieren. In Abhängigkeit von Beschichtungsdauer und Spannung lassen sich unterschiedlich dicke Beschichtungen realisieren, die auch in porösen Materialien möglich sind. Da diese Schichten aus Hydroxylapatit mit bioresorbierbaren Polymeren biokompatibel sind, lassen sich so Wirkstoffe über einen längeren Zeitraum im Organismus freisetzen. Die Freisetzung ist dann abhängig von der Resorptionsgeschwindigkeit der Schicht. Im Verlauf dieser Arbeit wurden zunächst plättchenförmige Substrate aus dotiertem Silicium und Titan verwendet. Ebenso kamen poröse Titansubstrate zum Einsatz.

Zur weiteren Erhöhung der Bioverträglichkeit werden seit geraumer Zeit strukturierte Substrate in der Literatur beschrieben [47, 49, 183-188]. Nicht nur Material, sondern auch Oberflächenbeschaffenheit tragen zur Bioverträglichkeit bei. In der Literatur finden sich verschiedene Methoden, um strukturierte Apatitschichten für Zellkulturexperimente zu nutzen [189]. Aus diesem Wissen heraus wurde die Idee entwickelt, eine Schicht aus diesen

Nanopartikeln durch Laser zu strukturieren [190, 191]. Als Substrate wurden Silicium-Wafer und reine Titanbleche verwendet. Das Silicium diente hierbei als Modelloberfläche, weil es aufgrund seiner Planheit im REM gut zu charakterisieren war. Desweiteren ließ sich der Laserfokus dort besser einstellen. Grundbedingungen für das Silicium war eine Dotierung mit Phosphor oder Arsen, um auch bei geringeren Spannungen leitend zu sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in Kapitel **3.5** dargestellt. Die elektrophoretische Beschichtung diente somit dazu, die erste Dimension der Struktur zu realisieren. Durch die Laserstrukturierung sollte dann die 2. Dimension hinzugefügt werden. Als nächsten Schritt wurden dann solche strukturierten Substrate im Zellexperiment untersucht. Hierbei sollte festgestellt werden, ob und wie Zellen auf eine unstrukturierte Oberfläche und im Gegensatz dazu auf eine strukturierte Oberfläche reagieren. Die Ergebnisse dazu finden sich in Kapitel **3.6**.

3.4.1 Elektrophoretische Beschichtung von Plättchen aus Silicium und Titan mit funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln

Als Ausgangsdispersion wurden Nanopartikel verwendet, die mit Polyvinylpyrrolidon oder Polyethylenimin funktionalisiert waren. Als Ausgangskonzentration wurden Dispersionen gewählt, die 2-4 g Nanopartikel pro Liter enthielten. Die getrockneten Kolloide wurden dazu in 2-Propanol aufgenommen und 30 min lang im Ultraschallbad redispergiert. Die Spannung wurde im Bereich von 25-75 V variiert. Die Beschichtungsdauer lag zwischen 10 und 30 s. Jene so erhaltenen Beschichtungen ließen sich von den Schichtdicken her gut kontrollieren. Ebenso wies die Schicht keine Trocknungsrisse auf, wenn eine Dicke von 2 μm nicht überschritten wurde. Eine Bestimmung der Schichtdicke erfolgte nach den Experimenten zur Laserstrukturierung mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM). Um einen geringen Verbrauch an Dispersionen zu haben, wurde der aus der Diplomarbeit [144] entstandene Aufbau zur Abscheidung modifiziert (Abbildung 42).

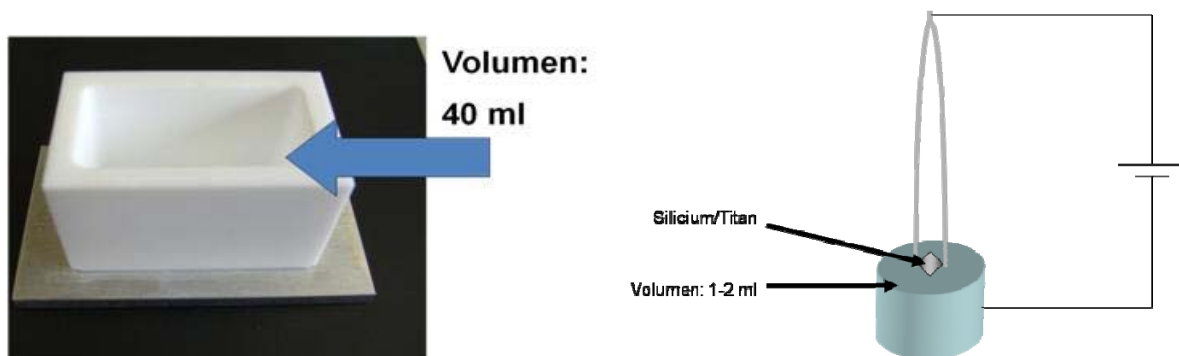


Abbildung 42: Gegenüberstellung des alten Versuchsaufbaus (links) gegenüber dem neuen miniaturisierten Aufbau (rechts).

Die wichtigste Variation in den Aufbauten bestand darin, dass die Position der Probe von einer Vertikalen in eine Horizontale verschoben wurde. Die Probe tauchte dazu nur leicht in die Dispersion ein. Der Becher bestand nun nicht mehr aus PTFE, sondern aus Edelstahl, um ihn direkt als Elektrode zu nutzen (Abbildung 42). Nach der erfolgten Beschichtung wurde die Probe herausgezogen und mit Druckluftspray vorsichtig getrocknet. Die so erhaltenen Substrate waren wesentlich gleichmäßiger als alle in der alten Apparatur erhaltenen Beschichtungen. Mit wesentlich geringerem Aufwand ließen sich

nun auch Proben beschichten, für die nur eine geringe Menge an Dispersion zur Verfügung stand.

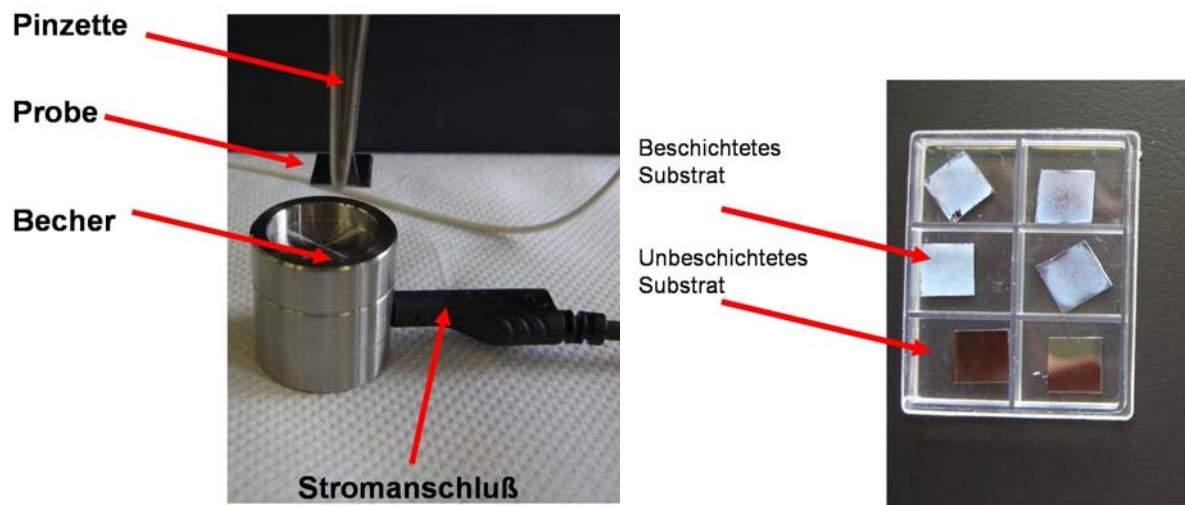


Abbildung 43: Die Versuchsanordnung zur elektrophoretischen Beschichtung von polarisierbaren Substraten (links) und der damit dargestellte Beschichtungen auf Silicium (rechts).

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 44 zeigen sehr deutlich die gleichmäßige Beschichtung der Oberfläche mit den Calciumphosphat-Nanopartikeln. Die Größenverteilung der Partikel zeigt keine Änderung zu den Aufnahmen einer getrockneten Dispersion. Die Schichtdicke ist auf diese Weise nicht direkt zu erkennen. Diese lässt sich auf REM-Aufnahmen an Bruchkanten und Kratzern nur ungefähr auf etwa 2 μm bestimmen. Weiterhin zeigen sich keinerlei Risse in der Beschichtung.

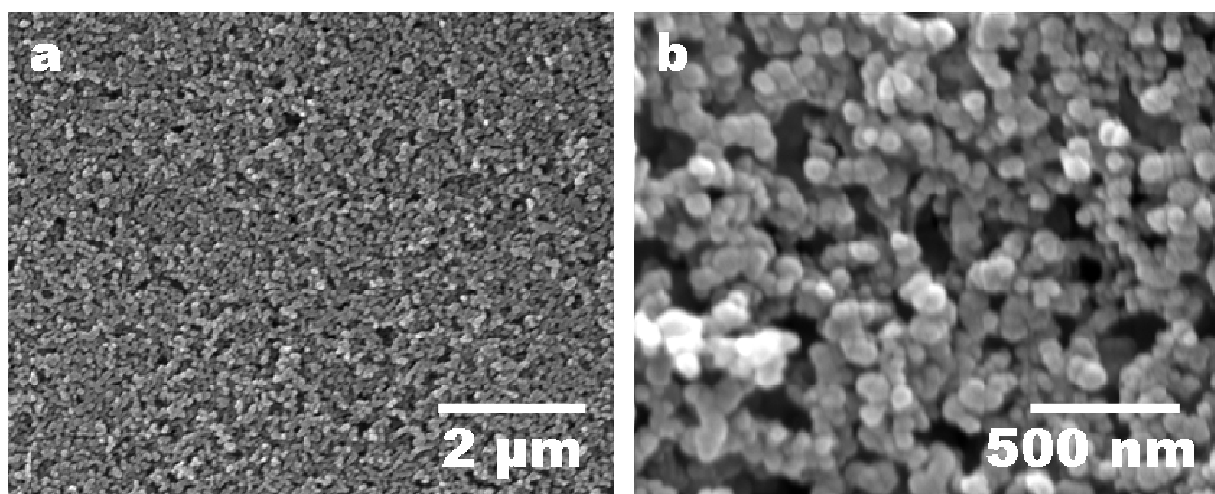


Abbildung 44: PVP-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel nach elektrophoretischer Abscheidung auf einem Titanblech.

Die PVP-funktionalisierten Nanopartikel wiesen in Wasser eine starke Agglomeration auf, da ihr Zeta-Potential im Bereich von Null lag. Die sterische Stabilisierung reichte ebenfalls nicht aus, um eine Agglomeration und Sedimentation in Wasser zu verhindern. Umso überraschender verliefen die Beschichtungsversuche. Die so dargestellten Kolloide ließen sich aus 2-Propanol sehr gut abscheiden. Die Abscheidung erfolgte an der positiv polarisierten Elektrode, ein Zeichen für eine negative Ladung des funktionalisierten Partikels oder präziser, ein negatives Oberflächenpotential. Eine Erklärung findet sich dafür nur im doppelt gebundenen Sauerstoff. MOPAC-Berechnungen für ein Kettenstück PVP lassen auf ein polares Molekül schließen. Der eventuell protonierbare Stickstoff (Abbildung 45, blau) im Ring wird durch die anderen Molekülteile abgeschirmt. Somit bleibt nur die negative Teilladung des Sauerstoffs (Abbildung 45, rot) übrig. Es ist somit gar nicht unbedingt nötig, geladene Polymere zur Funktionalisierung zu verwenden; eine Partialladung des Polymers reicht für die Bewegung im elektrischen Feld aus.

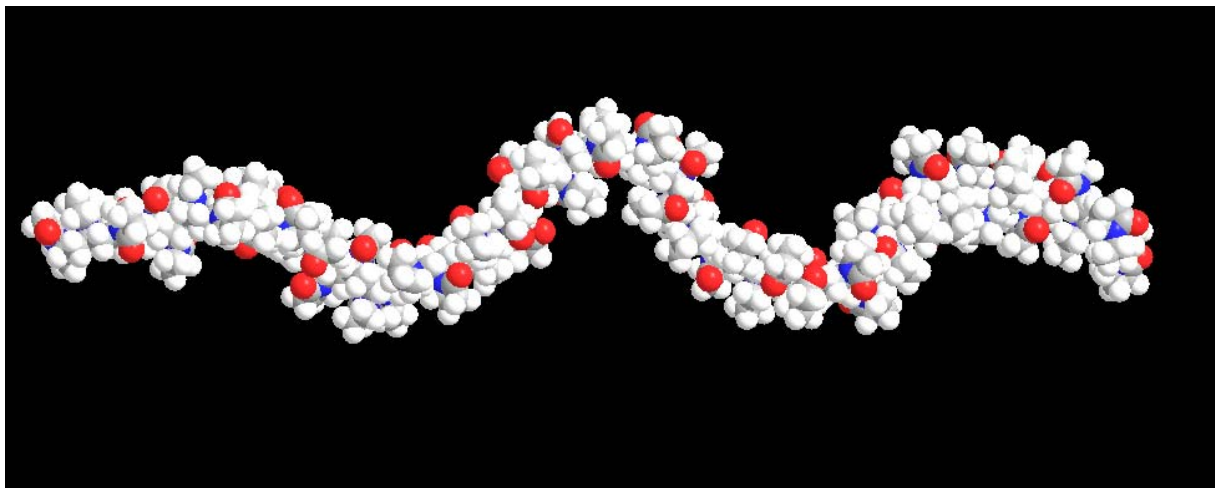


Abbildung 45: MOPAC-Berechnung eines Stücks der PVP-Polymerkette. Die roten Sauerstoff-Atome sind gut sichtbar, die Stickstoffatome (blau) sind vom restlichen Molekül verdeckt kaum sichtbar.

3.4.2 Beschichtung von porösen Substraten aus Titan

Um die Frage zu klären, ob sich durch die elektrophoretische Beschichtung auch poröse Formkörper im Inneren beschichten lassen, wurden in Kooperation mit dem Forschungszentrum Jülich zylinderförmige, poröse Titansubstrate untersucht [192]. Die Wirkung von porösen und mikrostrukturierten Titan auf Osteoblasten wurde von vielen Arbeitsgruppen untersucht [49, 193-198]. Um die Biokompatibilität solcher poröser Implantate weiter zu verbessern, sollten diese im Inneren mit Calciumphosphat-Nanopartikeln beschichtet werden. Dass solche Nanostrukturen zu einer weiteren Verbesserung der Zelladhäsion führen, ist in der Literatur bekannt [175, 184, 186, 187, 199-206]. Durch eine Strukturierung im Nanometerbereich lassen sich sogar völlig hydrophobe Substrate, wie Teflon, für Zellen adhärrierbar machen [47, 50, 207].

Zur Beschichtung wurde eine Dispersion von PVP-funktionalisierten Kolloiden in 2-Propanol (3 g L^{-1}) verwendet. Da der Edelstahlbecher nicht genug Lösung aufnehmen konnte, wurde ein tieferer Tiegel aus Platin verwendet, in den das Substrat ganz eintauchen konnte. Die Spannung betrug 50 V bei einer Beschichtungsdauer von 30 s. Nach dem Beschichtungsprozess wurde das Substrat 12 h bei 37 °C im Trockenschrank getrocknet, im flüssigen Stickstoff eingefroren und gebrochen. Die Bruchkante wurde im REM dann auf vorhandene Nanopartikel hin untersucht. Ergebnisse zu diesen Versuchen sind in Abbildung 46 dargestellt. Die REM-Aufnahmen eines so gebrochenen Werkstückes zeigen, dass auch im innersten Bereich der Poren die Nanopartikel abgeschieden wurden. Die Bedeckung der Oberfläche ist zwar gleichmäßig, aber doch sehr dünn. Die Kolloide in Abbildung 46d wurden blau koloriert, um den Kontrast deutlicher zu machen. Der Randbereich des Formkörpers wies allerdings eine wesentlich höhere Schichtdicke auf. Diese war an der weißen Färbung bereits nach der Beschichtung optisch zu erkennen. Die Erklärung dazu liegt in den Poren des Materials. Da die Außenfläche des Formkörpers direkten Kontakt zu der umgebenden Dispersion hatte, konnten sich dort auch viel mehr Partikel abscheiden als im Inneren. Die dort vorhandenen Partikel waren nach wenigen Sekunden abgeschieden. Neue Partikel hätten dann erst aus der restlichen Dispersion durch alle Poren hindurch wandern müssen. Weiterhin verkleinerte sich der Porendurchmesser durch die stark beladene Außenfläche. Eine schematische Darstellung dieses Prozesses findet sich in Abbildung 47. Die

linke Abbildung (**47a**) stellt eine Pore dar, die innen und außen mit Dispersion umgeben ist. Die rechte Abbildung (**47b**) zeigt, was passiert, sobald eine Spannung angelegt wird. Die Partikel in den Poren lagern sich ab, und die Außenfläche wird stark beladen, was zu einer Verstopfung der Pore führt und die weitere Bewegung von Kolloiden in die Pore verhindert (rote Pfeile).

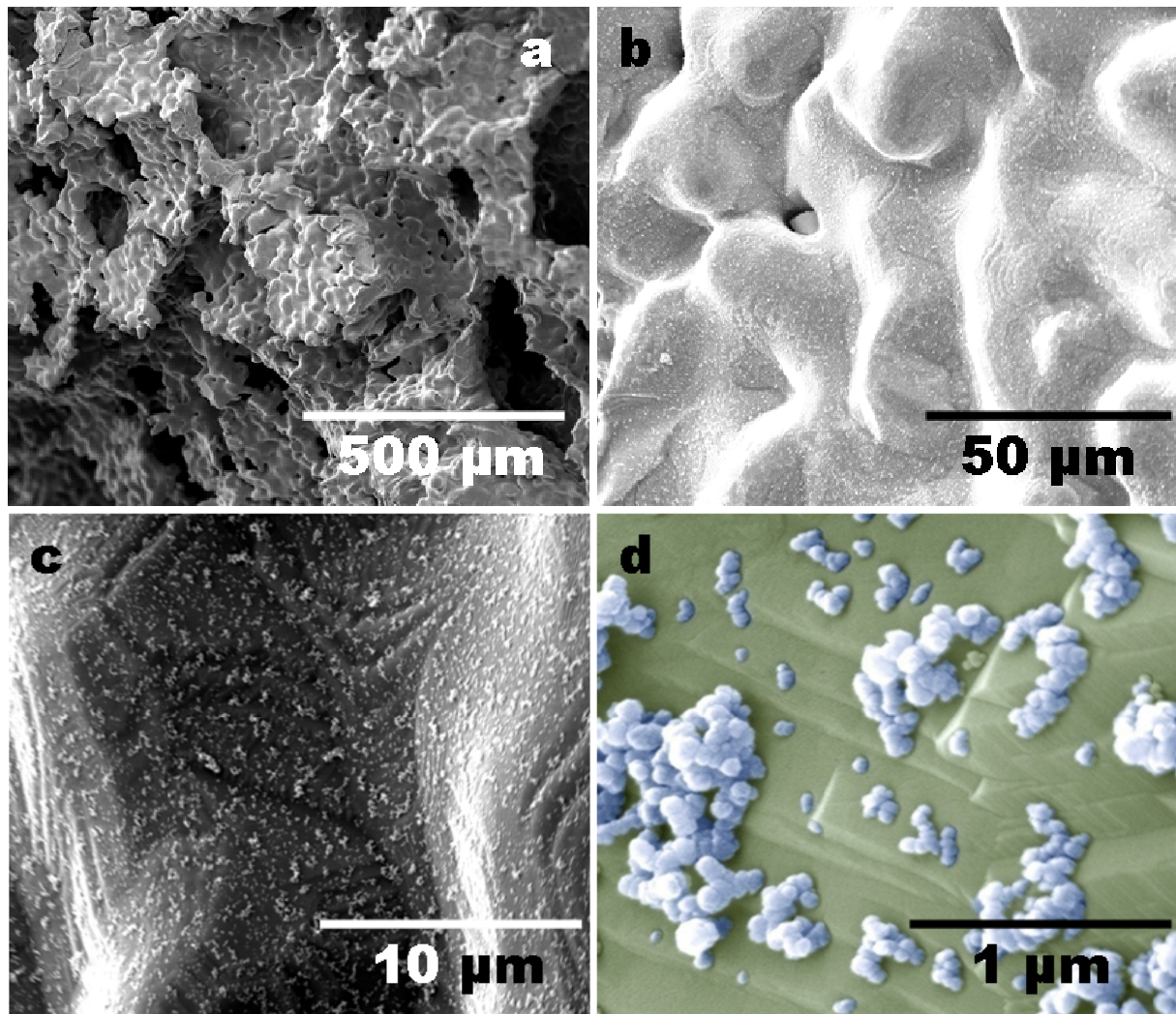


Abbildung 46: REM-Aufnahmen von dem Inneren des Titan-Probenkörpers nach der elektrophoretischen Beschichtung mit PVP-funktionalisierten Kolloiden.

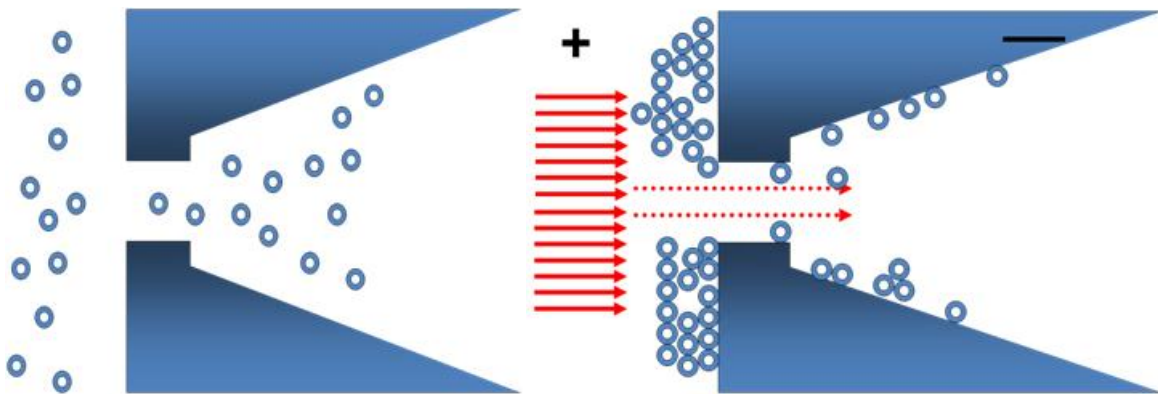


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Beschichtung von porösen Substraten. Die Dispersion ist zunächst gleichmäßig in den Poren verteilt. Beim Anlegen einer Spannung werden die Partikel in den Poren abgeschieden. Da außerhalb des Formkörpers mehr Partikel sind, wird das Äußere mehr beladen und verstopft die Poren, was eine weitere Mobilisierung von Kolloiden in die Pore verhindert.

Die Auswertung dieser Ergebnisse legte nahe, den Prozess der Beschichtung kürzer zu gestalten und zu intervallieren. Dazu wurden einige Substrate nur noch 10 s lang beschichtet und dann getrocknet, bevor sie erneut beschichtet wurden. Bei jedem neuen Eintauchen in die Dispersion füllte sich das Substrat mit neuer kolloidreicher Dispersion, welche dann bei Anlegen der Spannung abgeschieden wurde. Dies sollte das Problem der langsamen Diffusion von Kolloiden in die Poren umgehen. Zum Vergleich wurden Kontrollproben ebenfalls fünfmal in die Lösung getaucht und getrocknet. Dies sollte den Effekt eines mehrfachen Dip-Coating im Vergleich zur Elektrophorese darstellen.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 48 zeigen das gebrochene Substrat nach dem Dip-Coating. Bild 48a zeigt eine Übersichtsaufnahme des Substrats. Hier ist sehr schön die poröse Struktur des Formkörpers erkennbar. In Bild 48b sieht man bei 20000-facher Vergrößerung schon Bereiche des Titans, die ungleichmäßig beschichtet sind. Manche Stellen sind sogar völlig frei von Kolloiden. Die Aufnahme 48c zeigt einen Bereich der Oberfläche, wo man sehr gut die einzelnen Partikel erkennen kann, die aber auch noch in einigen Agglomeraten vorliegen. Im Gegensatz zu 48b steht Aufnahme 48d, die eine dicke Belegung mit den Kolloiden zeigt. Hier sind offensichtlich beim Trocknen die meisten Kolloide sedimentiert.

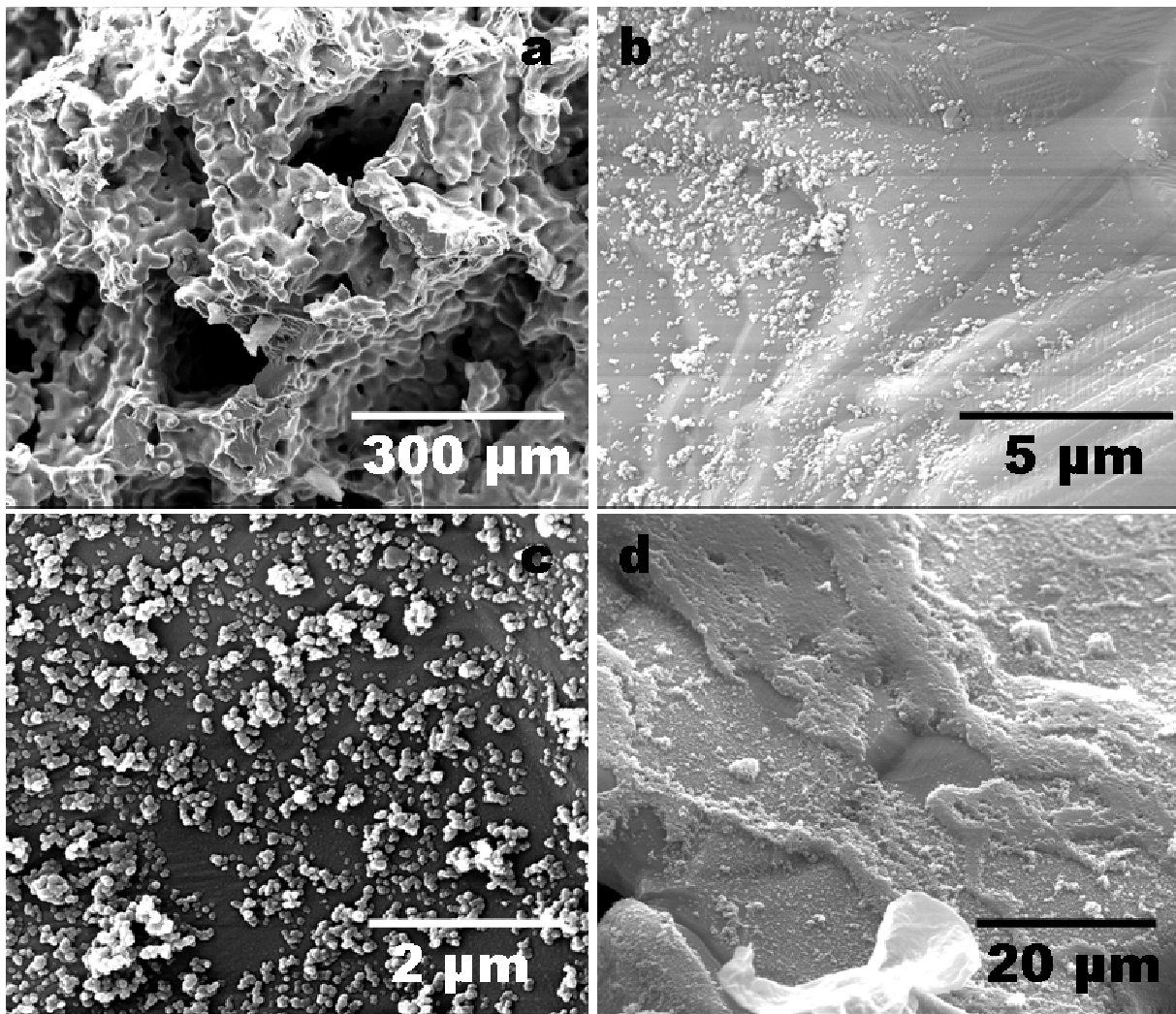


Abbildung 48: REM-Aufnahmen eines porösen Titansubstrats nach einer Dip-Coating Beschichtung mit Kolloiden. Die Verteilung der Kolloide im Formkörper ist ungleichmäßig und reicht von wenigen Partikeln (b) bis zu einigen µm-dicken Bereichen (d).

Im Gegensatz dazu erscheint auf den REM-Aufnahmen der elektrophoretisch beschichteten Formkörper die Bedeckung der Oberfläche gleichmäßiger und dichter (Abbildung 49). Bild 49a ist eine Übersichtsaufnahme des Substrats, 49b eine 4000-fache Vergrößerung des zentralen Punktes des Körpers. Hier ist schon eine gleichmäßige Belegung sichtbar. Bei noch höherer Auflösung (Abbildung 49c) sieht man eine dichte Schicht von Kolloiden, die das Innere des Titansubstrats bedeckt. Diese Beschichtung hat eine große Ähnlichkeit mit den Ergebnissen der plättchenförmigen Substrate (siehe Abbildung 44).

Nicht nur bei optischer Betrachtung, sondern auch auf REM-Aufnahme 49d sieht man eine dicke Schicht von Kolloiden auf der Außenfläche des Formkörpers, hervorgerufen durch die hohe Beladung mit Nanopartikeln.

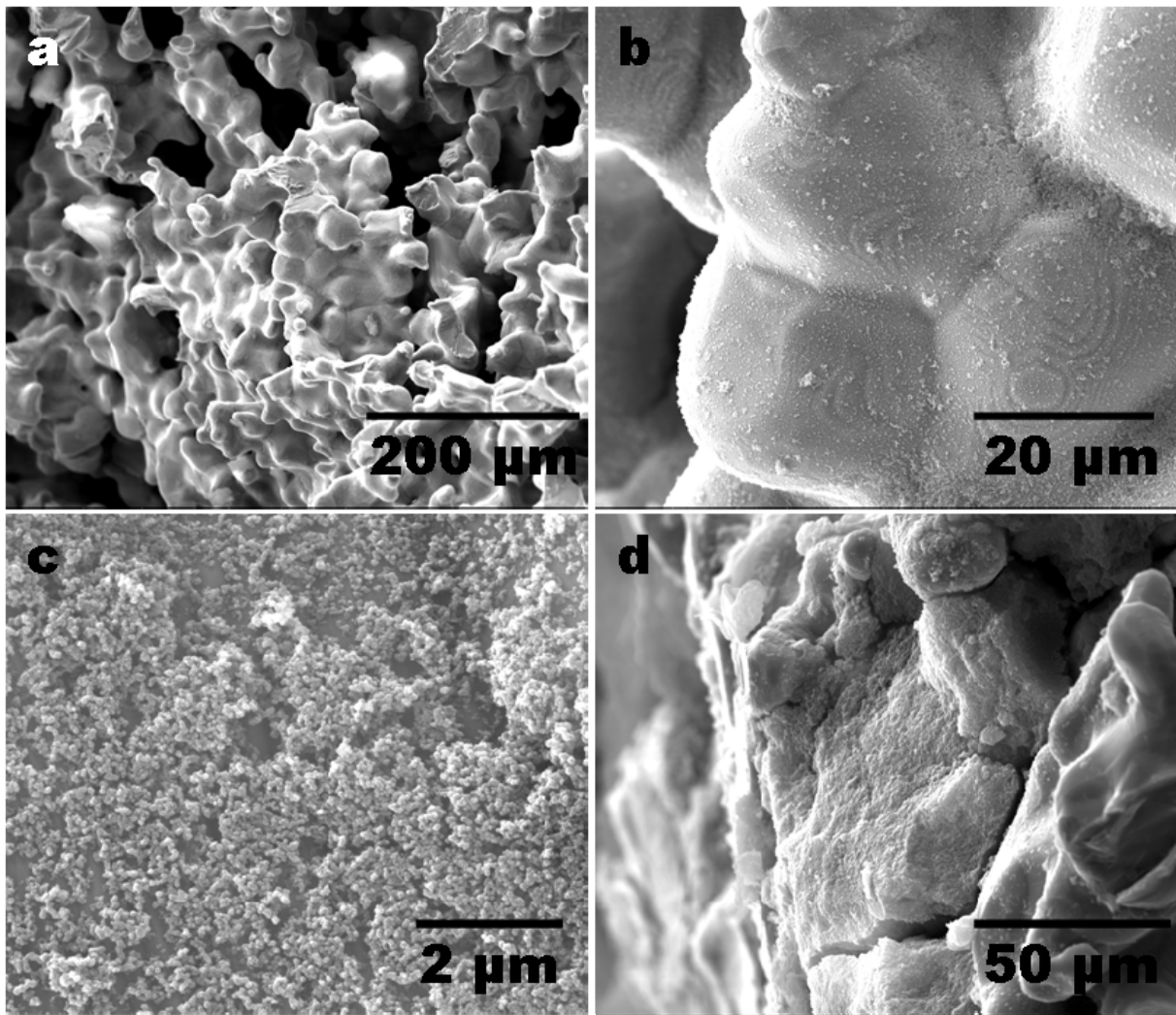


Abbildung 49: REM-Aufnahmen von elektrophoretisch beschichtetem Titanformkörper. Die elektrophoretische Beschichtung wurde fünfmal durchgeführt, was zu einer höheren Schichtdicke im Inneren führte (c). Dennoch blieb der Außenbereich am dichtesten mit Kolloiden belegt (d).

Bei den Untersuchungen der Probenbereiche, die näher am Rand lagen, konnte keine dickere Schicht festgestellt werden als im zentralen Punkt. Dies deutet darauf hin, dass die Partikel, die sich abgeschieden haben, alle aus der Dispersion stammten, die beim Eintauchen in die Poren gespült wurde. Beim Beschichten selbst sind aufgrund der stark verzweigten Porenstruktur keine Partikel aus der den Körper umgebenden Dispersion in das Substrat gewandert.

Die elektrophoretische Beschichtung solch poröser Substrate ist also nur in einem mehrstufigen Prozess möglich. Eine Beschichtung allein reicht nur für eine dünne Belegung aus. Die Frage ist allerdings, wie dick eine solche Schicht für eine bestimmte Anwendung überhaupt sein sollte.

3.4.3 Zusammenfassung der elektrophoretischen Beschichtungsversuche

Zusammenfassend lässt sich ein positives Resümee aus den Versuchen zur elektrophoretischen Beschichtung von polarisierbaren Substraten ziehen. Die Beschichtung von flachen Substraten, wie den hier verwendeten Silicium-Wafern und Titanblechen, lässt sich leicht mit einem geringen Aufwand durchführen. Der apparative Aufbau lässt sich so einstellen, dass sowohl sehr kleine Probenmengen von 1 mL bis zu den hier verwendeten 40 mL eingesetzt werden können. Dies ließe sich sicherlich noch nach oben erweitern. Die Begrenzung liegt hier im Labormaßstab in der Verfügbarkeit ausreichender Mengen an Nanopartikel-Dispersionen.

Als Polymere zur Funktionalisierung haben sich besonders PVP und PEI bewährt. Beide sind günstig zu beziehen und liefern in Alkohol gute Dispersionen. Die Beschichtung lässt sich mit beiden Stoffen gleichmäßig erzeugen. Für die Experimente zur Laserstrukturierung und Zellausrichtung wurde das PVP zur Funktionalisierung ausgewählt. Es ist, wie oben schon erwähnt, über das EU-Recht bereits in Formulierungen zugelassen.

Die Beschichtung poröser Titansubstrate ließ sich ebenfalls erfolgreich bewerkstelligen. Hier ist allerdings ein höherer Aufwand nötig, da sich die Substrate im Inneren nur in einem wiederholenden Prozess gleichmäßig beschichten lassen. Ein Vorteil gegenüber einem Dip-Coating-Prozess liegt hier nur in der gleichmäßigeren Schichtdicke. Um einfach nur einen nanopartikulären Stoff, der eventuell mit Wirkstoff beladen ist, einzubringen, wäre eine EPD nicht nötig.

Der Hauptnachteil der EPD liegt in der geringen Schichthaftung. Die Partikel auf der Oberfläche werden nicht durch kovalente Wechselwirkungen gebunden. Es gibt lediglich schwache Adhäsionskräfte wie van-der-Waals-Kräfte. Die Partikel selbst können untereinander noch über die Polymere verbunden sein. Diese Brückenflockungen tragen zu einem stärkeren Verbund der Schicht selbst bei. Eine Auswirkung auf eine stärkere Schichthaftung hat dies nicht. Zur Verbesserung der Schichthaftung wäre es eine Möglichkeit, das Substrat nach der Beschichtung mit den Kolloiden noch mit einer Polymerschicht, wie PDLLA oder PLA, zu überziehen. Dass ein solcher Verbund von Metall und Polymerwerkstoff sehr günstige mechanische Eigenschaften aufweist, wurde von Lagoa et al. an einem künstlichen „Strut-Graft-Implantat“ gezeigt [179].

Weiterhin ließe sich z.B. das Titansubstrat über eine Ätztechnik anrauen, um dadurch den Kolloiden mehr Haftgrund zu bieten. Eine Sinterung der Partikel auf dem Titansubstrat würde zum einen den Verbund der Schicht stärken, zum anderen auch die Anbindung an das Substrat. Leider geht dadurch die Nanostruktur in eine Mikrostruktur über. Abbildung 50 zeigt ein Titansubstrat, welches mit Calciumphosphat-Kolloiden beschichtet wurde. Danach wurde es im Ofen bei 1000 °C gesintert. Das Ergebnis sind verschmolzene Agglomerate, deren Struktur aus etwa 1-2 µm großen Tröpfchen besteht. Der Schmelzpunkt von Hydroxylapatit liegt bei über 1280 °C [208]. Die Tatsache, dass diese Partikel dennoch verschmolzen sind, liegt in der wesentlich geringeren Kriechtemperatur aufgrund des nanopartikulären Zustands.

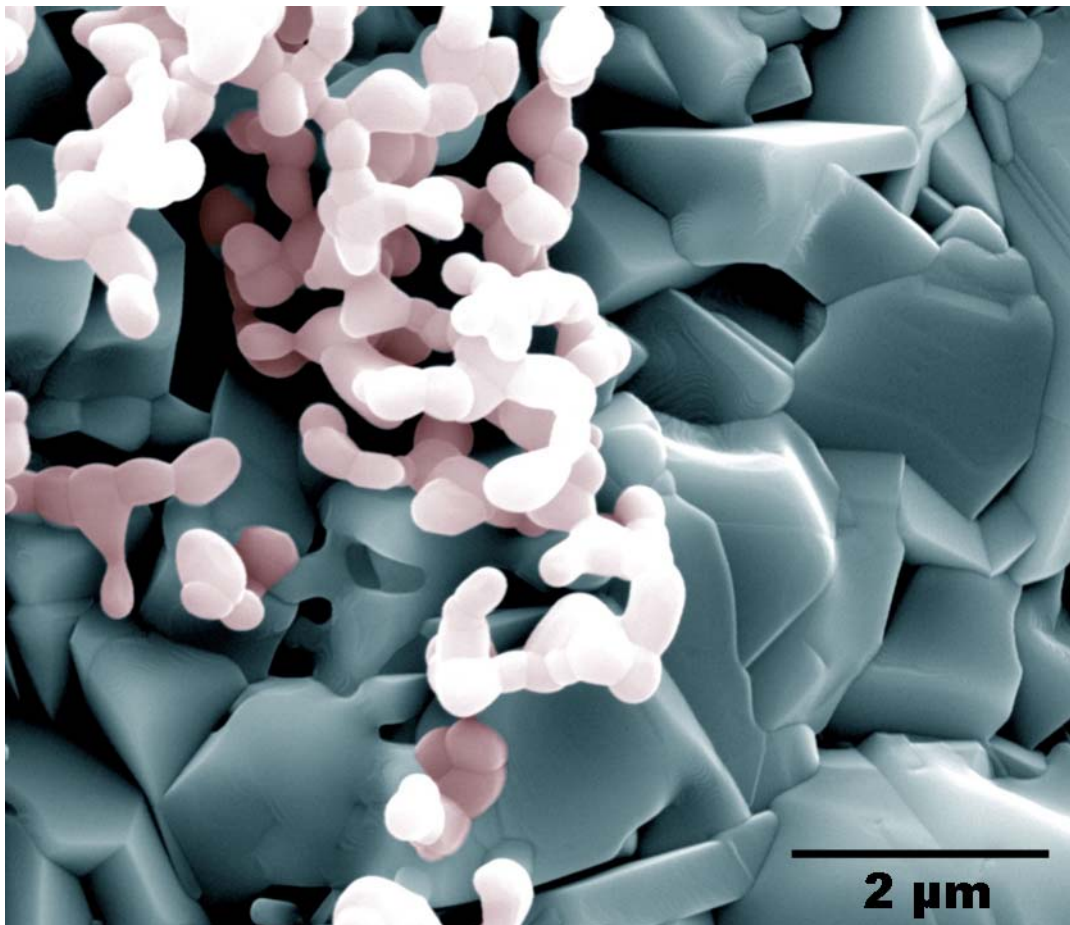


Abbildung 50: Gesinterte Calciumphosphat-Kristalle auf einem Titansubstrat. Zur besseren Kontrastierung wurden der Apatit rot und das Titansubstrat blau koloriert.

3.5 2-D Laser-Patterning von beschichteten Substraten auf der Basis von Silicium und Titan

In Kooperation mit dem Institut für Physikalische Chemie an der Universität Duisburg-Essen (Prof. Dr. E. Hasselbrink, Dr. N. Hartmann, Dr. S. Franzka), wurden die auf diese Weise hergestellten Substrate (Spannung 30 V, Beschichtungsdauer 30 s) dann durch Laser strukturiert. Es wurden sowohl Präparate auf Titan-, als auch auf Siliciumbasis verwendet. Abbildung 51. zeigt den schematischen Aufbau der Laserstrukturierungsanlage. Zu Strukturierung wurde ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 514 nm verwendet. Entscheidend ist noch die Tatsache, dass nicht der Laser über die Probe, sondern die Probe über den Laserstrahl bewegt wurden. Hierzu wurde die Probe auf einen Tisch mit Präzisionsmotor gespannt und über den Fokus des Laserstrahls mit einem Schrittmotor präzise bewegt. Am schwierigsten gestaltet sich deshalb die Fokussierung des Lasers auf dem Substrat. Auch nur geringe Unebenheiten der Probenoberfläche heben die Probe so über oder unter den Fokus des Lasers. Auf den Silicium-Wafern spielt dies nur eine geringe Rolle. Der Wafer hat nur Unebenheiten, die sich im Bereich von einigen Atomlagen bewegen. Auch die Schicht aus Nanopartikeln weist nur eine geringe Unebenheit auf. Diese liegt allerdings immer noch um einige Zehnerpotenzen höher als im Vergleich dazu der Silicium-Wafer.

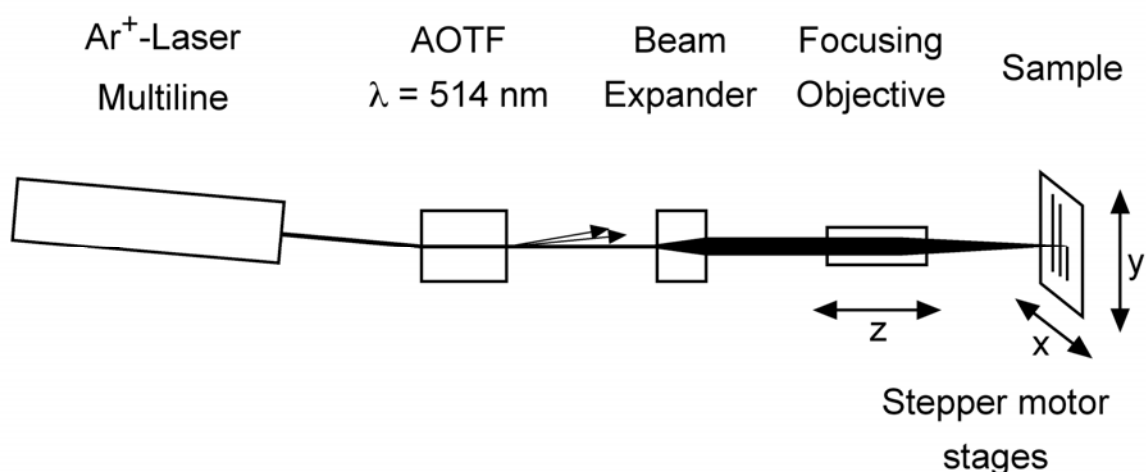


Abbildung 51: Schematischer Aufbau der Laser-Strukturierungs-Anlage mit den relevanten Aufbauten.

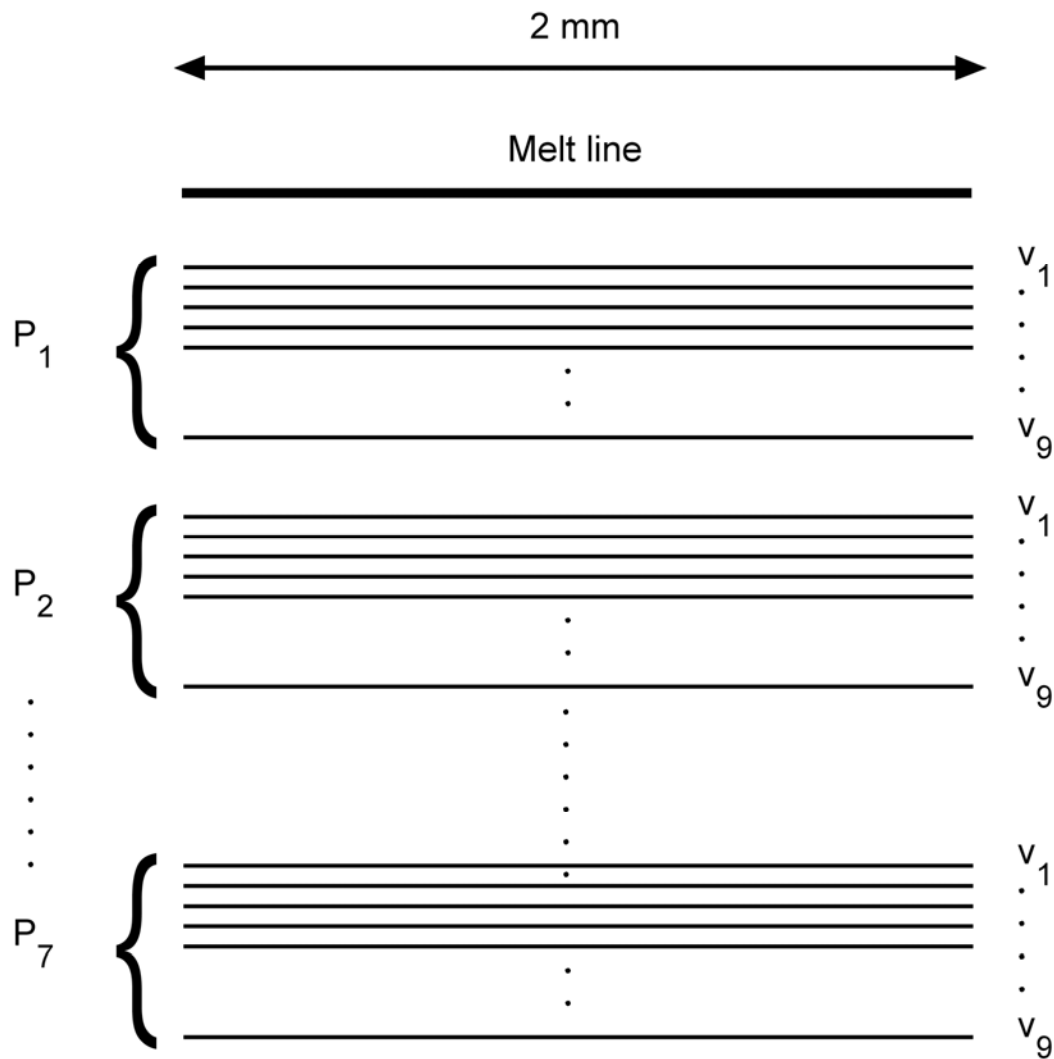


Abbildung 52: Schematische Darstellung der erzeugten Linienstrukturen durch die Laser-Strukturierung.

Für die Strukturierung der Titansubstrate wurde eine Laserstärke zwischen 405 mW (Block P_1) und 60 mW (Block P_7) variiert. Bei Silicium-Substraten wurde die Energie zwischen 304 mW (Block P_1) und 100 mW (Block P_7) variiert. Bei beiden Substraten wurde die durchschnittliche Schreibgeschwindigkeit zwischen $0,5 \text{ mms}^{-1}$ (v_1) und 25 mms^{-1} (v_9) variiert. Dies diente dazu festzustellen, inwieweit unterschiedliche Energien und Geschwindigkeiten Auswirkungen auf das Linienmuster ergeben. Eine hohe Energie sollte theoretisch zu einem kompletten Schmelzen der Schicht führen. Eine hohe Geschwindigkeit sollte diesen Effekt wiederum abmildern. Bei geringer Energie und hoher Geschwindigkeit sollte die Energie des Lasers am Auftreffpunkt der Schicht zu gering sein, um einen Effekt beobachtbar hervorzurufen.

3.5.1 Laser-Patterning von beschichteten Siliciumwafern

Die Aufnahmen in Abbildung 53 zeigen die erhaltenen Strukturen auf einem Silicium Substrat. Bei hoher Energie und hoher Geschwindigkeit des Lasers sind die Strukturierungen gleichmäßig. Dies ist deutlich daran erkennbar daran, dass die obersten Linien der obersten Blöcke saubere Schmelzkanten aufweisen. In Abbildung 53a zeigt sich, dass eine hohe Geschwindigkeit zu unregelmäßigen Rändern führt, die sogar durchbrochen sind. Bedenkt man die geringe Adsorption der Partikel und des Polymers bei der hier verwendeten Wellenlänge des Lasers, so ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der Laserstrahl eventuell durch die Beschichtung hindurch drang und kaum vom Substrat adsorbiert worden ist. Im Substrat führt die Adsorption des Laserstrahls dazu, dass die Energie sich schnell in Wärme umwandelt.

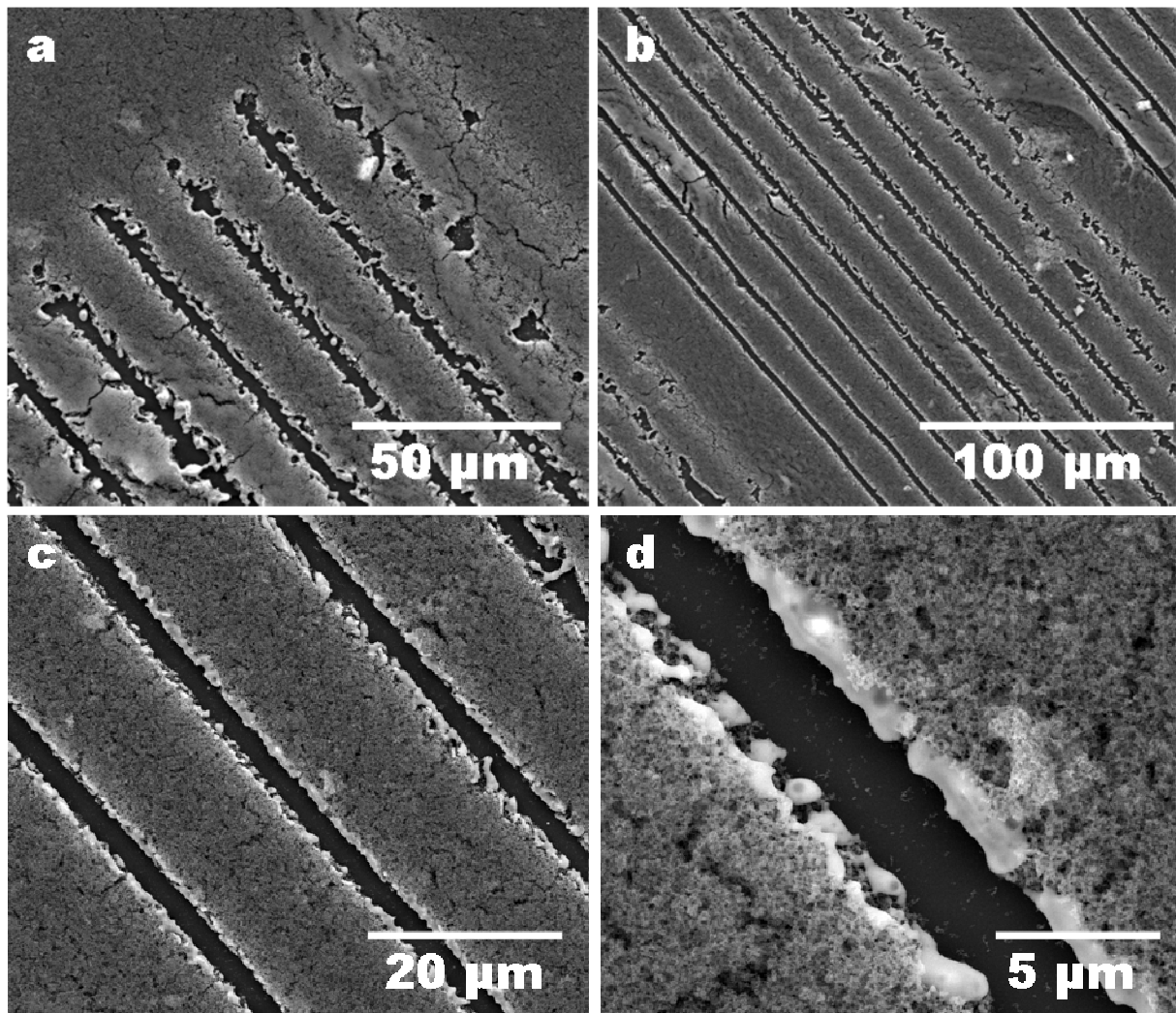


Abbildung 53: REM-Aufnahmen der Laser-strukturierten Substrate.

In Abhängigkeit von der Laserenergie und der Schreibgeschwindigkeit führt dies zu verschiedenen Prozessen. Bei einer hohen Laserenergie und Schreibgeschwindigkeit wird die Beschichtung lokal entfernt und legt die glatte Oberfläche des Siliciums frei. Dieser Prozess basiert womöglich auf einem ähnlichen Mechanismus, auf den schon in anderen Studien hingewiesen wurde. Dieser Prozess wird dann als Laserreinigung (*laser cleaning*) bezeichnet [209, 210]. Im Detail bedeutet dies, dass durch die schnelle Verdampfung des Polymers, als auch durch eventuell vorhandenes Kristallwasser die Partikel durch eine dem Laserstrahl voran gleitende Gaswolke von der Oberfläche gefegt werden. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei geringerer Laserenergie und Schreibgeschwindigkeit partielle Sinterungen der Nanopartikel, und die Bildung von größeren Strukturen findet statt. Beispielsweise ersichtlich in Abbildung **53a** bei einer hohen Vergrößerung der Strukturen auf einem beschichteten Titansubstrat. Die Breite der Laserlinien ist normalerweise in der Größenordnung des Durchmessers des Laser-Fokus, der um die 3 μm liegt. Die Herstellung von Linien mit einem breiteren oder dünneren Durchmesser ist normalerweise möglich durch die Variation des Laserdurchmessers. Die technische Grenze ist bei einer Liniendicke von einem Mikrometer durch die Benutzung eines hoch fokussierenden Objektivs erreicht. Für die Herstellung von breiteren Strukturen ist es lediglich nötig, den Abstand zwischen den einzelnen Linien zu reduzieren.

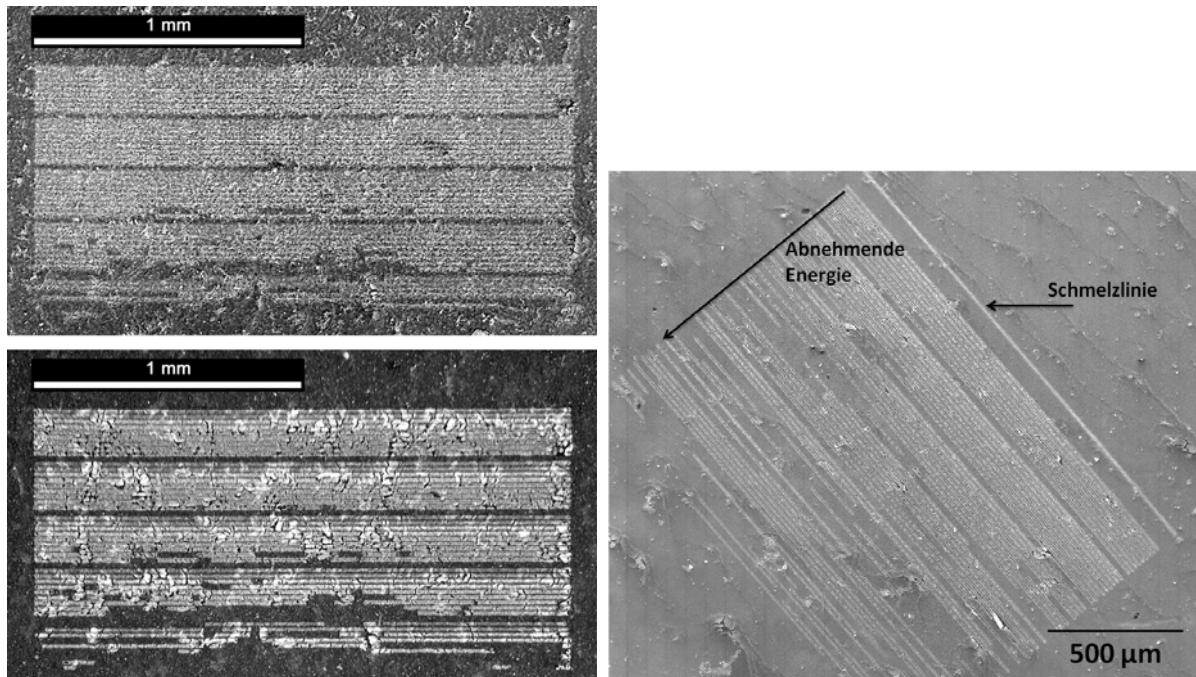


Abbildung 54: elektronenmikroskopische Aufnahme (oben) und lichtmikroskopische Aufnahme (unten; mit Polarisationsfilter) nach dem Schreibvorgang. Beide Methoden liefern ein Bild mit unterschiedlichen Resultaten; rechts die REM-Aufnahme eines Blockes mit den deutlich erkennbaren Schmelzlinien und den abbrechenden Reihen bei zu geringer Energie. Die Parameter der Strukturierung waren wie oben beschrieben eingestellt.

Der Vergleich in Abbildung 54 zwischen elektronenmikroskopischer und lichtmikroskopischer Aufnahme zeigt den Unterschied zwischen beiden Methoden und den Resultaten, die man aus beiden ableiten kann. Während das Elektronenmikroskop einen guten Tiefenschärfenkontrast liefert, fällt im Lichtmikroskop die unterschiedliche Haftung der Schicht auf. Bei den weißen Bereichen handelt es sich um abgelöste Stücke der Beschichtung. Ebenso deutlich erkennt man, wie Bereiche der Schicht nicht vollständig durch den Laser strukturiert wurden. Dies fällt deutlich durch den Polarisationsfilter auf, in dem der Apatit und der darunter liegende Wafer unterschiedliche Kontraste liefern.

3.5.2 Laser-Patterning von beschichteten Titansubstraten

Analog zu den Strukturierungen auf Silicium wurden Titanbleche untersucht, die mit PVP-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln elektrophoretisch beschichtet wurden.

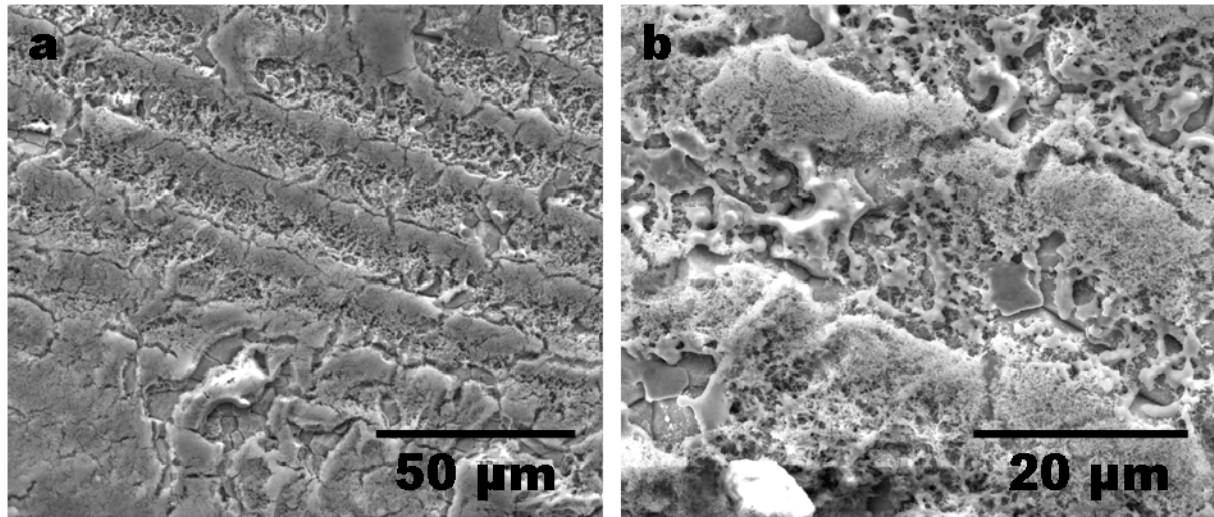


Abbildung 55: Laser Patterning auf einem Titansubstrat

Die Strukturen auf Titan unterscheiden sich leicht von denen, die auf Silicium erhalten wurden. Die Nanopartikel schmelzen teilweise zusammen und fügen sich zu netzartigen Strukturen zusammen (Abbildung **55b**). Ein komplettes „Cleaning“ wie bei den Siliciumsubstraten tritt nicht auf. Die Strukturierung selbst wirkt ungleichmäßiger und im direkten Vergleich zu den Siliciumsubstraten so, als wäre die Energie des Lasers gering und die Geschwindigkeit des Rasterns hoch gewesen. Die Hauptenergie des Laserstrahls wandelt sich wie beim Silicium in Wärme um, wird aber dann vermutlich im Metall abgeleitet. Titan ($21,9 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$) ist jedoch ein wesentlich schlechterer Wärmeleiter als Silicium ($148 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Dennoch sind die Laserstrukturen präziser und sauberer ausgebildet. Eine Erklärung hierfür ist nicht leicht zu finden. Ein Hauptgrund für die Unterschiede liegt aber wohl in der höheren Rauigkeit der Titanoberfläche. Das Substrat ist zwar maschinell vom Hersteller poliert worden, eine Oberflächenrauigkeit von auch nur einem μm ist jedoch ungleich höher als die wenigen Atomlagen Differenz auf einem Silicium-Wafer. Damit liegt der Fokus des Lasers so gut wie nie exakt auf der Oberfläche der Struktur. Die poröse Nanopartikel-Beschichtung wechselwirkt nur gering mit dem Laserstrahl. Dies wird deutlich in Abbildung **54**, wo die Bereiche der Strukturierung, die völlig unberührt vom Laser scheinen, dennoch

mit dem Laser abgerastert worden sind. Wenn der Laser nicht exakt auf die Oberfläche fokussiert ist, so kann sich auch nur ein geringerer Teil der Laserenergie in Wärme umwandeln. Die erzeugte Temperatur reicht dann nicht für ein „Lasercleaning“ aus.

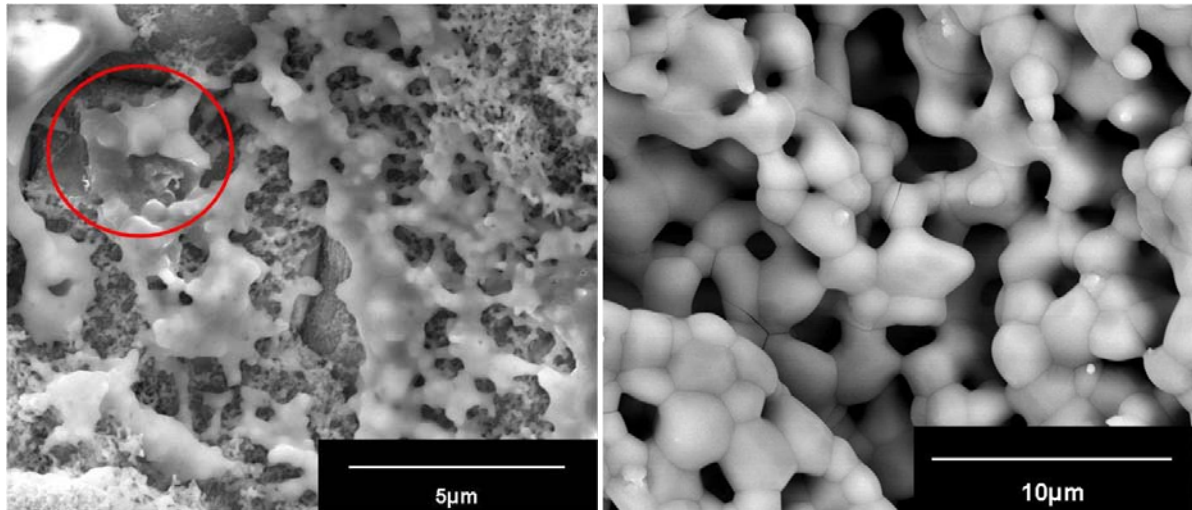


Abbildung 56: REM-Aufnahme eines Bereichs der Laserstrukturierung auf Titan. Die rot umrahmte Schmelzstruktur entspricht der einer gesinterten Probe (links, 1000 °C für 5 h) [148].

Abbildung **56a** zeigt eine 20000-fache Vergrößerung einer Linie auf Titan. Die rot umrandete Struktur ist äquivalent mit Abbildung **50**. Hier wurde eine Probe der Nanopartikel für 5 h bei 1000 °C gesintert. Die erhaltenen Schmelzstrukturen sehen aus wie miteinander verwachsene Tropfen in einem Größenordnungsbereich von 1-2 µm. Insgesamt wirkt die Struktur porös und netzartig verwachsen. Ein Erreichen der Schmelztemperatur von Hydroxylapatit (1280 °C) kann durch diese Ergebnisse ausgeschlossen werden. Aufgrund des nanopartikulären Aufbaus des Materials setzt die Kriechtemperatur einige 100 °K niedriger ein. Die Nanopartikel verlaufen ineinander und bilden dann die tropfenartigen Schmelzstrukturen aus. Da ein kompakteres Material wesentlich weniger raumfüllend ist als die Schicht aus Nanopartikeln, ergibt sich daraus eine poröse Struktur.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Laserstrukturierung nach elektrophoretischer Abscheidung der Nanopartikel eine schnelle und einfache Möglichkeit darstellt, 2-dimensionale Strukturen zu erzeugen. Eine biokompatible Schicht von funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln lässt sich so ohne die Notwendigkeit einer Maske, wie sie bei lithographischen Verfahren nötig ist, im Bereich von mehreren Mikrometern unter

atmosphärischen Bedingungen strukturieren. Die Kombination dieser Vorteile macht dieses Verfahren so interessant für verschiedene Anwendungen. Eine sehr interessante Anwendung wäre die Steuerung der Adhäsion und Ausrichtung von Osteoblasten-artigen Zellen auf so strukturierten Substraten. Es ist gegenwärtig bekannter Stand der Technik, dass Wachstum und Bewegung von Zellen auf Oberflächen von der chemischen Beschaffenheit der Oberfläche und deren topographischen Struktur auf Mikro- und Nanometer-Ebene abhängen. Die Abhängigkeit der Bewegung von Osteoblasten auf mikrostrukturiertem Titan zum Beispiel, konnte von Liao 2003 und Scandella 1996 gezeigt werden [198, 211]. Das Wachstum von Neuronen als anderem Beispiel konnte von Sasabe 1998 entlang einer Linie aus Peptiden auf einer Oberfläche gesteuert werden [212]. Aus diesem Grund lag es nahe, nachdem die Herstellung solcher Template mit diesem Verfahren möglich ist, festzustellen, ob sich Zellen auch an diesen Strukturen ausrichten würden.

3.6 Ausrichtung von Zellen auf laserstrukturierten Schichten

Um die Ausrichtung von Zellen auf den Templaten zu studieren, wurden Siliciumwafer mit einer 2 µm dicken Schicht aus PVP-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln elektrophoretisch beschichtet. Dass Zellen gut an Schichten auf Basis von Calciumphosphat haften, ist in der Literatur bekannt. Die Fragestellung hier war, inwieweit sich eine Wachstumsrichtung aufgrund der Laserstrukturierung vorgeben ließ. Die chemische Beschaffenheit der Oberfläche sollte aufgrund des Apatits keine negativen Auswirkungen haben. Inwieweit die Zelle eine Oberfläche aus Apatit „spürt“ oder welche Proteine dort primär und sekundär adsorbiert haben, wurde für das Anhaften der Zellen bereits für Titan von Choi et al. gezeigt [213]. Dass eine Variation der Oberflächentopographie im Bereich von 2-20 nm auf Titan keinerlei Auswirkung auf das Anhaften von Zellen hat, konnte von Jandt et al. gezeigt werden [214]. Schneider et al. zeigten jedoch 2004 [215], dass eine Strukturierung im Mikrometerbereich entscheidende Impulse für die Differenzierung von Zellen angibt. Diese verschiedenen Aspekte müssen alle berücksichtigt werden, will man eine Beschichtung für ein Implantat entwickeln, welches eine Verbesserung des gegenwärtigen medizinischen Standards darstellt. Insbesondere das Anwachsen eines Implantats stellt die große Herausforderung dar. Hiervon hängt ganz entscheidend die Lebensdauer bis zum Versagen der Struktur ab. Osteoblasten-artige Zellen (MG63), Zellen des Knochenmarks oder MC3T3-E1 Zellen konnten erfolgreich durch den Kontakt entlang linearer Gräben und Brücken ausgerichtet werden. Diese Ausrichtung erfolgte auf Materialien wie Polystyrol, Silicium, diamantartigem Kohlenstoff, Hydroxylapatit und Titan [216-218]. Ein weiterer Hinweis auf die Unabhängigkeit vom Material, solange es auch nur halbwegs biokompatibel und hydrophil ist.

Als Zelltyp wurde eine Zelllinie aus Mäusen (MC3T3-E1) gewählt, dies sind osteoblastenartige Zellen aus embryonalem Mausgewebe. Sie sind dafür bekannt, auf vielen Biomaterialien zu wachsen und zu proliferieren. Ebenfalls wurde dieser Typ schon von Wenstrup auf ähnlichen Strukturen kultiviert [217]. Die verwendeten Siliciumwafer hatten eine Abmessung von 10x10 mm². Das Plättchen wurde in Quadranten eingeteilt. Zur Kontrolle wurde Polystyrol

als Standard verwendet, und es wurden manuell mit einem Diamantstift Gräben in das Silicium geritzt, um den Effekt von Laserstrukturierung in der Nanopartikelschicht zu vergleichen. Ebenso wurden Zellen auf nichtstrukturierte Bereiche ausgesiedelt, um ein allgemeines Verhalten der Zellen auf einer Nanopartikelschicht zu beobachten. Da die Haftung der Schicht auf dem Träger nicht sehr hoch ist, wurden einige Proben nach der Laserstrukturierung kurz im Ofen bei 1000 °C getempert. Die Haftung der Apatitschicht sollte so erhöht werden, wenngleich die Eigenschaft „Nano“ der Beschichtung auf diese Weise verloren ging. Die hier vorgestellten Zellexperimente auf den beschichteten und strukturierten Substraten wurden am Institut für Physiologie am Universitätsklinikum Essen (Prof. Dr. D. Bingmann, Dr. M. Wiemann) durchgeführt.

3.6.1 Fluoreszenzmikroskopische Ergebnisse der Zellexperimente auf laserstrukturierten Templaten

Zur Überprüfung der Vitalität und der Motilität der Zellen wurden diese im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierzu wurden die Zellen zuvor mit Calcein angefärbt. Calcein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Biologie häufig verwendet wird. Es wird der Acetoxymethylester des Calceins zugegeben, welcher durch die Zellmembran eindringen kann und dann von Enzymen in der Zelle zum Calcein aufgespalten wird. Das Calcein komplexiert dann die Calcium-Ionen in der Zelle, was in einer starken grünen Fluoreszenz resultiert. Dieser Komplex kann die Zellmembran nicht mehr passieren und akkumuliert sich im Zytoplasma. Da tote Zellen diese Enzyme nicht mehr aktivieren können, leuchten im Mikroskop nur die vitalen Zellen. In Abbildung **57a** ist der Rand des laserstrukturierten Bereichs zu sehen. Deutlich hebt sich der Bereich mit diesen Zellen von dem Rest ab. Im unstrukturierten Bereich sind die Zellen zu clusterartigen Strukturen zusammengewachsen. Im Bereich der Laserstrukturierung sieht man keine Clusterung der Zellen, hier ist die Verteilung gleichmäßiger. Abbildung **57b** zeigt eine höhere Vergrößerung von Zellen auf einem nicht strukturierten Bereich. Deutlich erkennbar ist hier, dass alle Zellen vital sind und keinerlei Ausrichtung zeigen. Ebenso zeigen die Zellen keinerlei Ausrichtung auf einem manuell erzeugten Kratzer auf Silicium (Abbildung **57c**). Die Kratzer sind auf dieser Abbildung gut zu erkennen, ebenso

wie die Zellen, die keinerlei Ausrichtung oder Clusterung wie auf der Nanopartikel-Oberfläche zeigen. Die auf Abbildung 57d sichtbaren Zellen adhären auf manuellen Kratzern auf einer Nanopartikelschicht. Auch hier zeigt sich keinerlei Ausrichtung der Zellen; lediglich die Clusterung ist deutlich sichtbar.

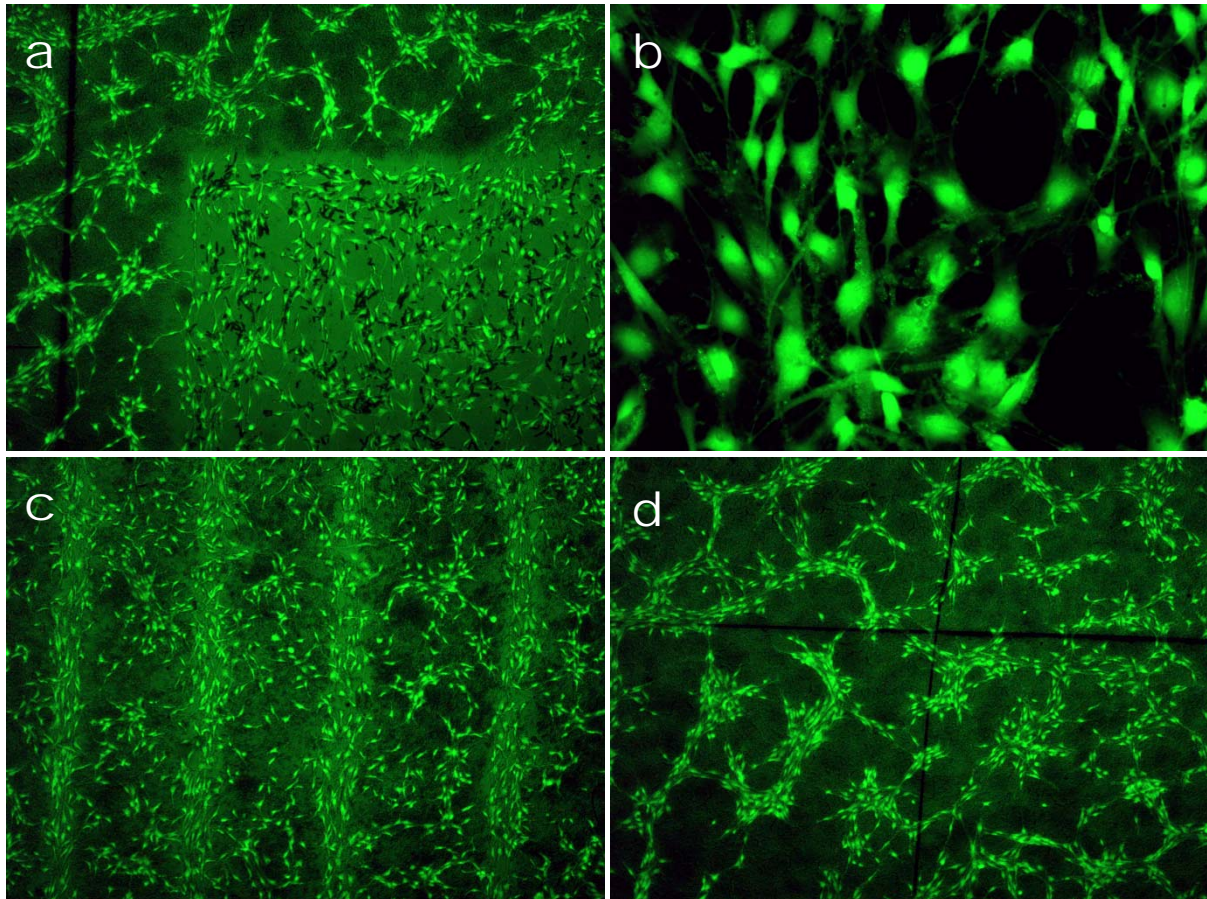


Abbildung 57: Fluoreszenzaufnahme von Zellen nach 24 h. **A:** Rand des laserstrukturierten Bereichs; **B:** Cluster von Zellen außerhalb des laserstrukturierten Bereichs; **C:** Manuell erzeugte Kratzer auf dem Silicium; **D:** Manuell erzeugte Kratzer auf der HAP Schicht.

In Abbildung 58a ist der Bereich der Laserstrukturierung vergrößert dargestellt. Deutlich erkennbar ist hier die parallele Ausrichtung der Zellen entlang der Gräben. Abbildung 58a wurde nach 24 Stunden aufgenommen, Abbildung 58b nach 36 Stunden. Hier ist erkennbar, dass eine Zellmitose stattgefunden hat. Mehr Zellen besiedeln den Bereich und alle neu gebildeten Zellen haben sich genauso wie alle vorher da gewesenen Zellen entlang der Laserstruktur ausgerichtet.

Die im polarisierten Licht aufgenommenen Bereiche in den Abbildung **58c** zeigt oben im Bild den laserstrukturierten Bereich. Er setzt sich deutlich vom unteren Teil des Bildes ab. Hier sind die Zellen wieder zu den Clustern zusammengewachsen. Die roten Pfeile markieren einige der Gräben. Dies soll die Parallelität der Zellen entlang der vorgegebenen Struktur verdeutlichen.

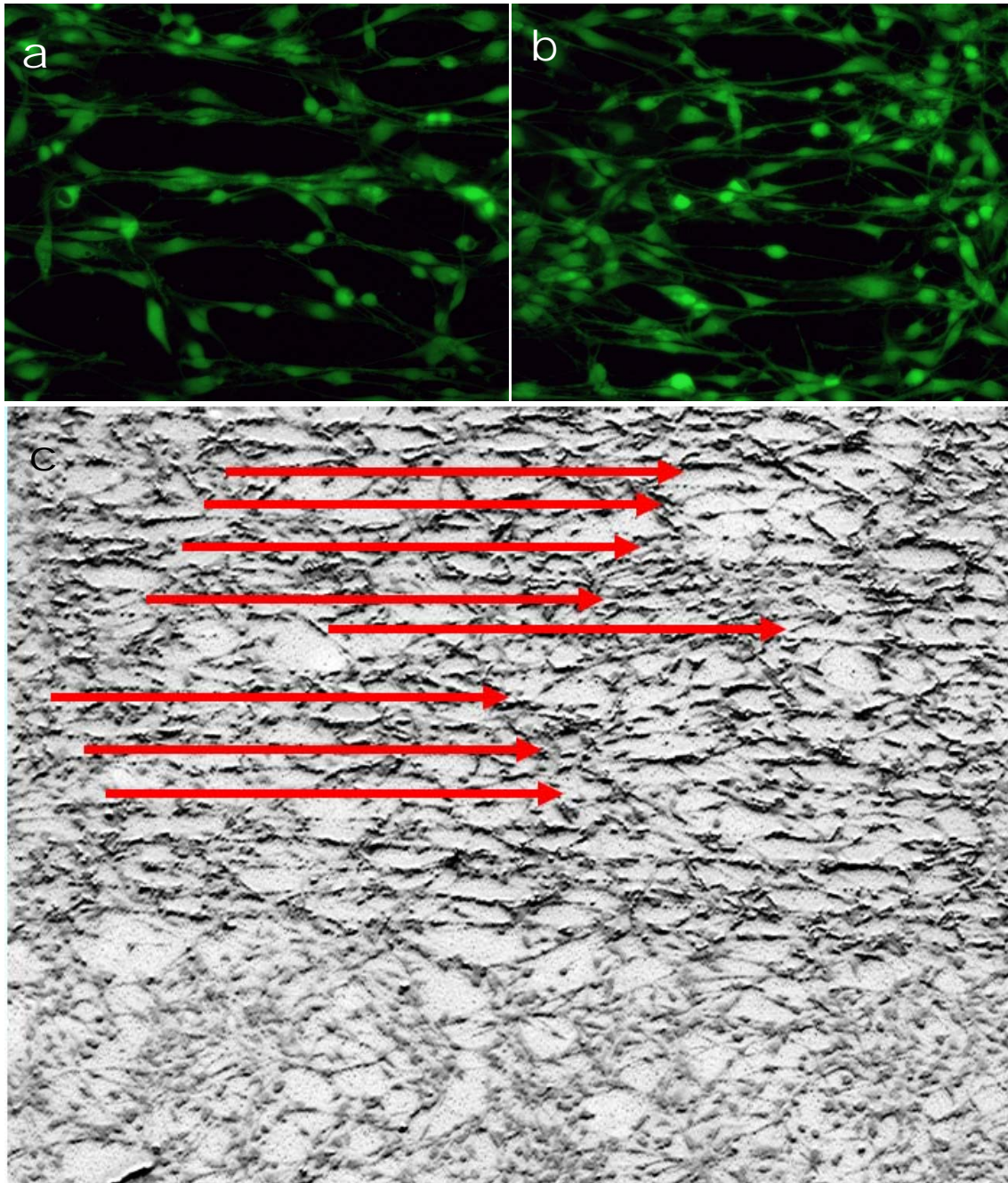


Abbildung 58: Ergebnisse der Zellexperimente auf den strukturierten Substraten. a: Nach 24 h, b: nach 36 h. Die roten Pfeile in c markieren die Linien entlang derer die Zellen sich ausgerichtet haben.

Um das Verhalten der Zellen vergleichen zu können, wurden Zellen auf Polystyrol ausgesiedelt. Zellkulturen werden standardmäßig in Petrischalen auf PS-Basis kultiviert. Das Polymer weist keine zytotoxischen Eigenschaften auf. Es ist aber auch nicht als biokompatibel anzusehen. Das linke Bild in Abbildung 59 zeigt sehr schön den Rand des beschichteten Wafers. Hier ist auf der rechten Seite der Grenze deutlich ein anderes Wachstum der Zellen erkennbar. Auf Polystyrol zeigen die Zellen eine statistische Verteilung auf der Oberfläche. Die Zellen auf der Nano-Apatit-Schicht sind eher etwas elongierter und neigen zu weniger Spreitung als auf Polystyrol.

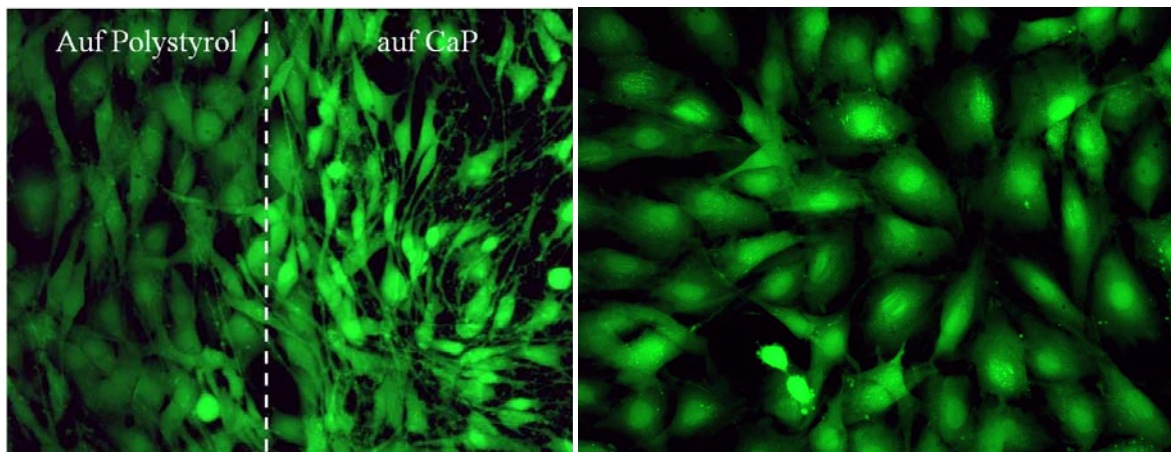


Abbildung 59: Vergleich der Polystyrolkontrolle (rechtes Bild) mit dem Randbereich des Siliciumwafers im Medium (linke Abbildung). Die eingezeichnete Grenze stellt die Kante des Wafers dar.

Um die Haftung der Schicht auf dem Träger zu erhöhen, wurden einige Proben bei 1000°C für 30 min getempert. Nach der Aussiedlung der Zellen wurden nach 24, 36 und 48 Stunden Fluoreszenzaufnahmen durchgeführt um auch hier das Verhalten der Zellen zu studieren. Abbildung 60a zeigt den oberen rechten Bereich der Laserstrukturierung. Die Linien sind hier deutlich erkennbar. Die Zellen in diesem Bereich erscheinen bei dieser Vergrößerung bereits ausgerichtet. Im nicht strukturierten Bereich sind die Zellen statistisch in alle Richtungen verteilt. Die Aufnahme 60b zeigt hier sehr deutlich die parallele Ausrichtung der Zellen im strukturierten Bereich nach 24 Stunden. Entscheidend ist hier, dass nicht nur die Zellen in den Gräben sich ausgerichtet haben, sondern auch die Zellen, die auf dem Apatit zwischen den Gräben sitzen. Offensichtlich wurde diesen Zellen, von den Zellen im Graben, ein Signal vermittelt, was diese Zellen dazu veranlasste, sich in die gleiche Richtung

auszurichten. Die Abbildung **60c** wurde nach 48 Stunden aufgenommen. Die Zellen haben sich nach einem weiteren Tag stark vermehrt. Sämtliche Zellen haben sich wie ihre Elternzellen an der Laserstruktur ausgerichtet, bzw. wie die Zellen unter ihnen, die noch Kontakt zu der Struktur haben. Die Zellen darüber haben keinen Kontakt mehr zu dem Apatit oder Wafer auf dem Boden. Die Informationen, die sie dazu veranlassen, sich auszurichten, wird hier auch wieder von den darunter liegenden Zellen gekommen sein. Die Zellen in Abbildung **60d** befinden sich auf einem nicht strukturierten Bereich. Die wahllose Ausrichtung der Zellen steht in starkem Gegensatz zu den Zellen in Abbildung **60b** und **60c**.

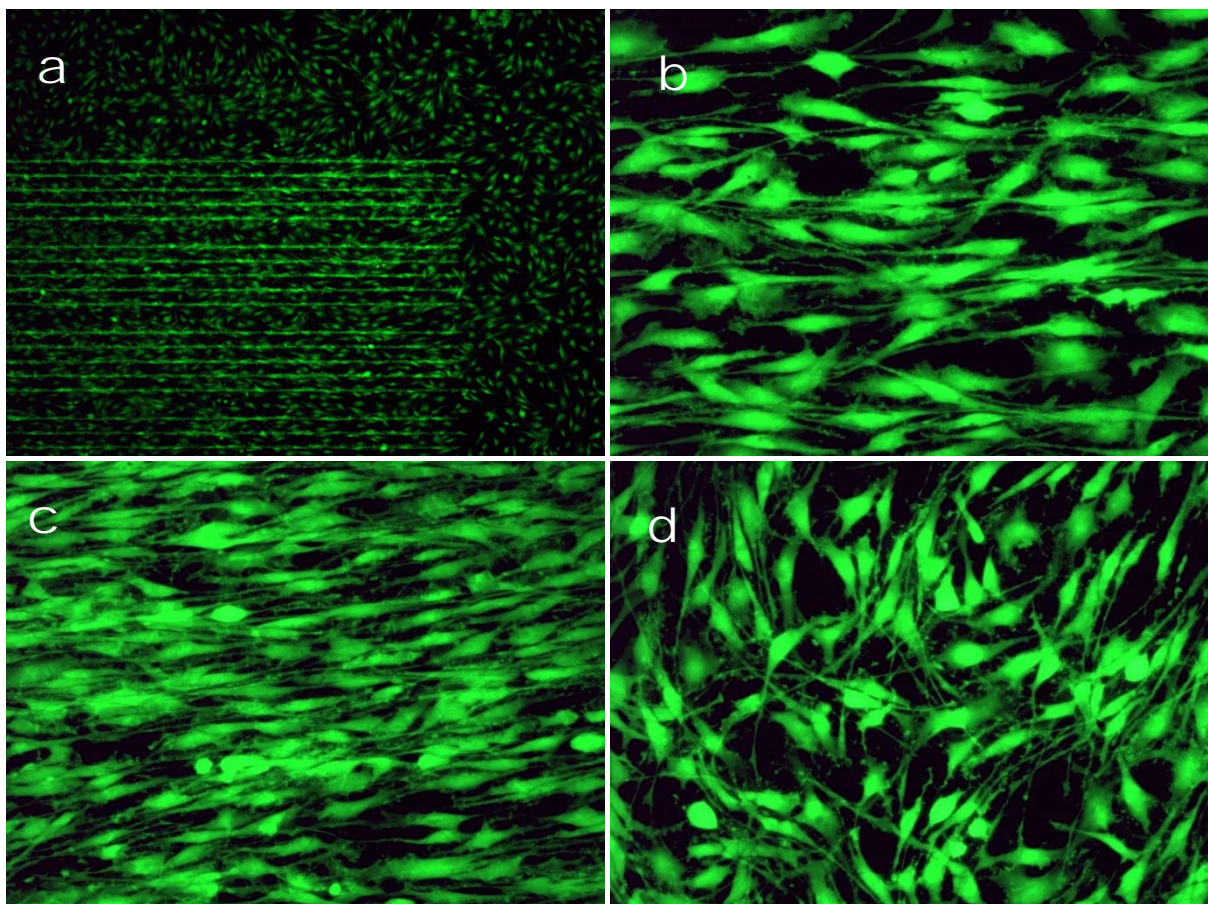


Abbildung 60: Fluoreszenzaufnahmen der getemperten Probe. A und B nach 24 h, C und D nach 48 h. Die Abbildungen A, B und C stellen den laserstrukturierten Bereich dar, D dazu im Vergleich den nicht strukturierten Bereich.

Im Vergleich zu den nicht getemperten Proben fällt auf, dass sich lediglich das Verhalten der Zellen im nicht strukturierten Bereich unterscheidet. Auf den getemperten Proben finden sich keine Zellen, die sich zu solchen Clustern zusammengefunden haben. Die Ausrichtung der Zellen entlang der strukturierten Bereiche fand sich in beiden Fällen wieder.

3.6.2 Elektronenmikroskopische Ergebnisse der Zellexperimente auf laserstrukturierten Templaten

Da das Auflichtmikroskop keine gute Tiefenschärfe liefert, wurden einige Proben entsprechend präpariert, um REM-Aufnahmen zu ermöglichen. Im Elektronenmikroskop wurden Zellen auf reinem Silicium, auf Silicium mit manuell eingebrachten Kratzern, auf laserstrukturierten Schichten aus Calciumphosphat-Nanopartikeln und auf getemperten Proben, ebenfalls vorher beschichtet, untersucht.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung **61a-d** zeigen Zellen auf einem reinen Silicium-Wafer. Die Zellen adhärieren auf der glatten Oberfläche und bilden mehrere μm lange Filopodien aus. Einige Zellen spreiten so weit auf der Oberfläche, dass sie mehrere $100\ \mu\text{m}^2$ einnehmen. Dies ist ein Zeichen dafür, dass die Oberfläche den Zellen wenig Halt bietet. Der Osteoblast in Abbildung **61d** wurde grün nachkoloriert. So ist der Hauptkörper der Zelle deutlich mit seinen extrazellulären Ausstülpungen, an deren Spitzen die fokalen Adhäsionskomplexe an der Matrix binden, vom Untergrund zu unterscheiden. Da das völlige Spreiten auf der Oberfläche den letzten Schritt einer zellulären Adhäsion darstellt, befindet sich diese Zelle kurz vor diesem Stadium.

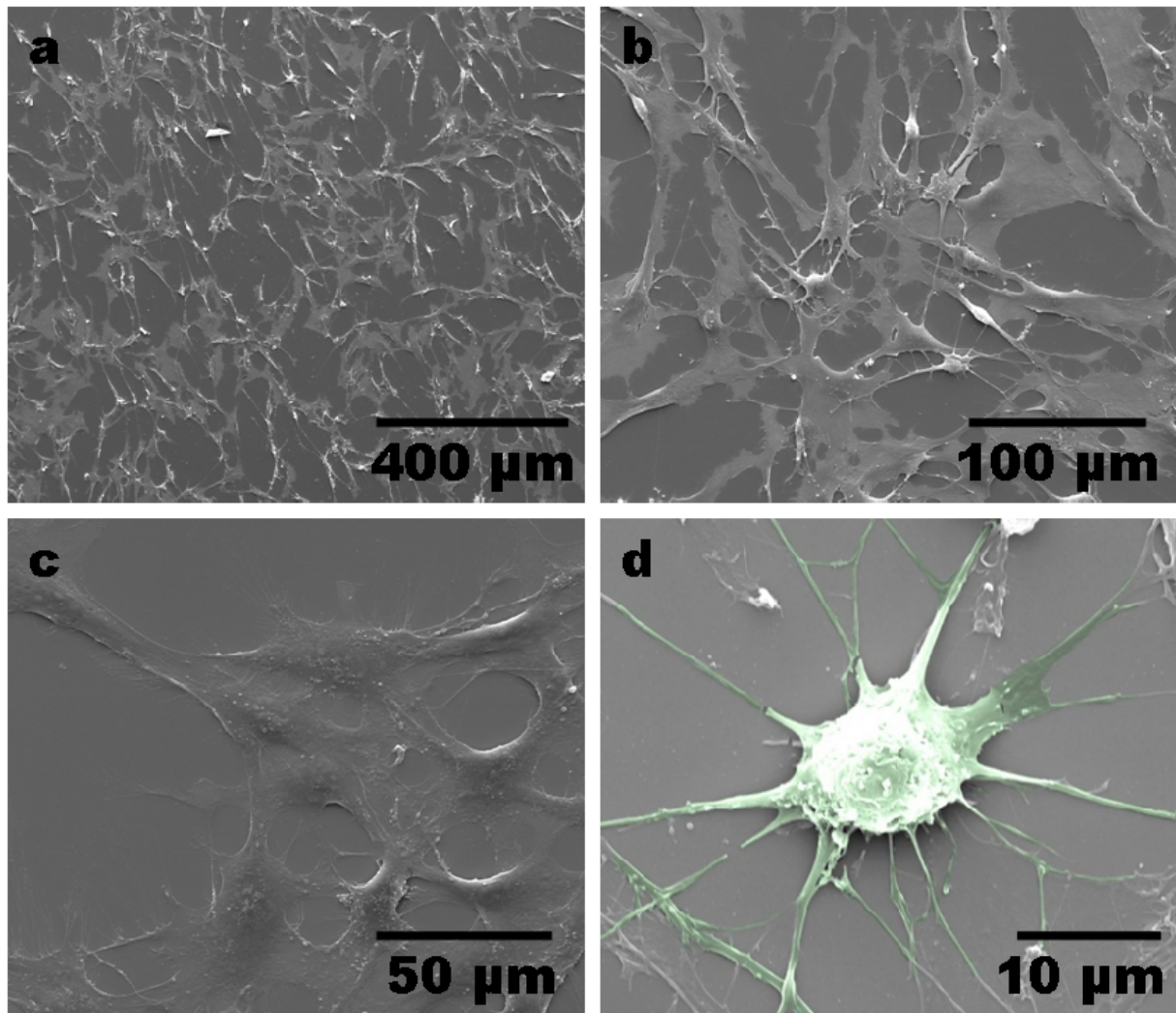


Abbildung 61: REM-Aufnahmen von MC3T3-Zellen auf unbeschichteten, reinem Silicium. Die Zellen spreiten sehr weit auf der glatten Oberfläche, sind aber vital. Aufnahme d wurde nachkoloriert, um den Zellkörper des Osteoblasten deutlicher vom Substrat hervorzuheben.

Die Siliciumsubstrate, auf denen mit einem Diamantstift lineare Kratzer erzeugt wurden, weisen nach Auswertung der mikroskopischen Bilder keine Tendenz auf, Zellen bei ihrem Adhärieren zu beeinflussen. Die Aufnahmen in Abbildung 62 zeigen, wie die Zellen über die gesamte Oberfläche spreiten. Sie lassen sich in keiner Weise von den Gräben beeinflussen. Die interzellulären Verbindungen überbrücken die Kratzer zwischen den Zellen mit Leichtigkeit. Die Zellkörper wirken so, als würden sie die Gräben durchfließen.

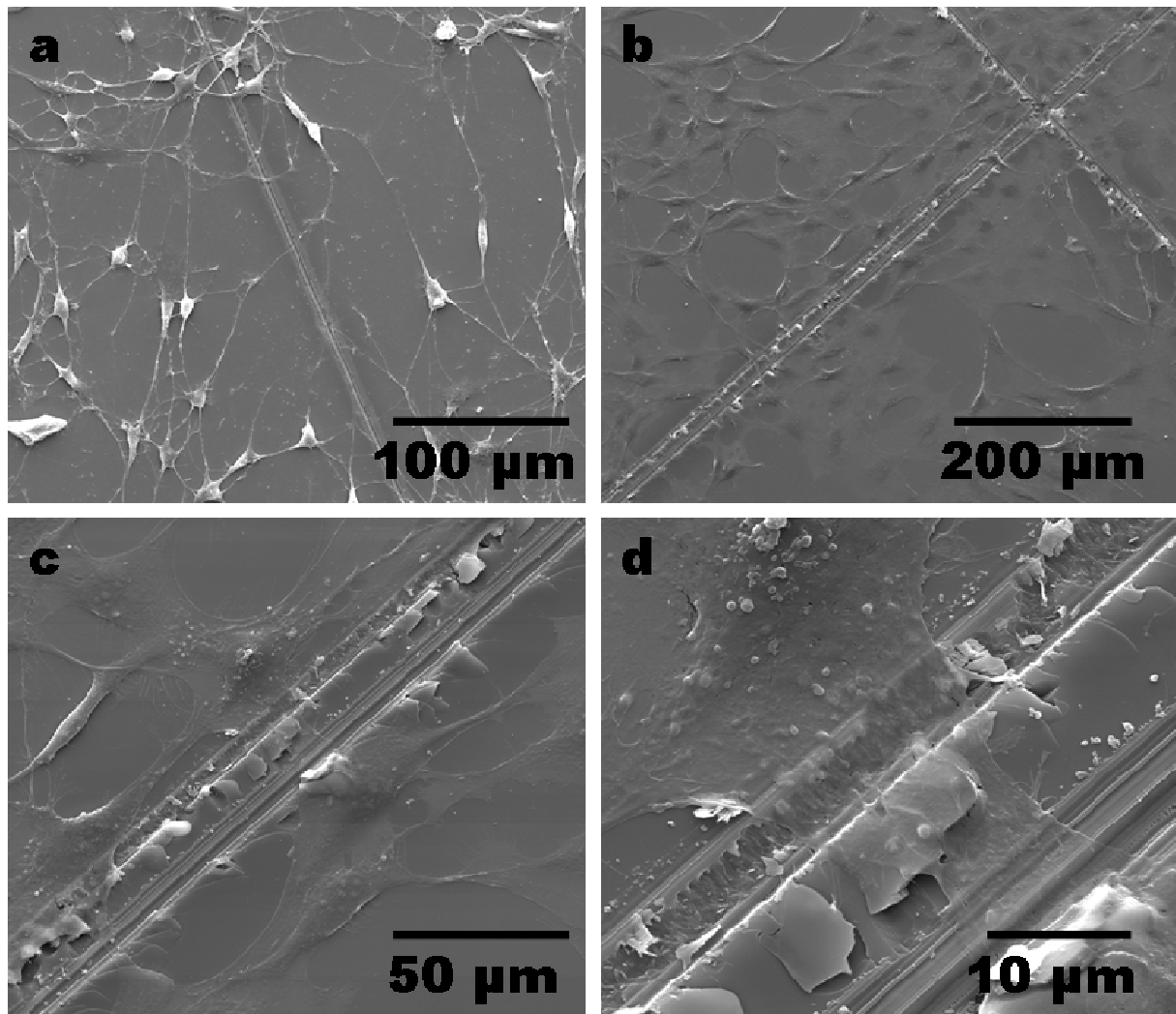


Abbildung 62: REM-Aufnahme von Zellen auf Silicium mit manuell eingebrachten Kratzern. Die Zellen zeigen keinerlei Ausrichtung entlang der Gräben.

Nachdem die fluoreszenzmikroskopischen Bilder bereits eine Ausrichtung der Zellen entlang der Strukturen ergeben hatten, sollten die elektronenmikroskopischen Bilder dies nur bestätigen und weitere Daten zu der Zellmorphologie liefern. Anhand der REM-Aufnahmen konnte man erkennen, dass sich die Beschichtung im Bereich der Laserstrukturierung komplett abgelöst hatte. Lediglich die Zellen waren noch im Augenblick ihres letzten Zustands bei der Fixierung auf der Oberfläche vorhanden. Da die Laserstruktur beim Aussiedeln der Zellen offensichtlich noch vorhanden gewesen sein muss, lässt sich deren Abwesenheit vermutlich durch ein Präparationsartefakt erklären. Dennoch ist der laserstrukturierte Bereich deutlich zu erkennen. Die „knotenartige“ Struktur der Zellen im nicht strukturierten Bereich tritt deutlich zu Tage. Weiterhin ist ersichtlich, dass sich die Zellen in diesen Clustern zu Multilagen angesiedelt haben. Es ist von

Osteoblasten bekannt, dass die Bildung solcher Zellaggregate in Kulturen einer weiteren Differenzierung der Zellen vorangeht (publiziert von Mundy 1994, [219]). Ebenso ist es in der Literatur bekannt, dass sich Knochenzellen auf einer hydrophilen, mikrostrukturierten Oberfläche leichter Differenzieren lassen (publiziert von Stanford 2004 und Brunette 2007 [215, 220]).

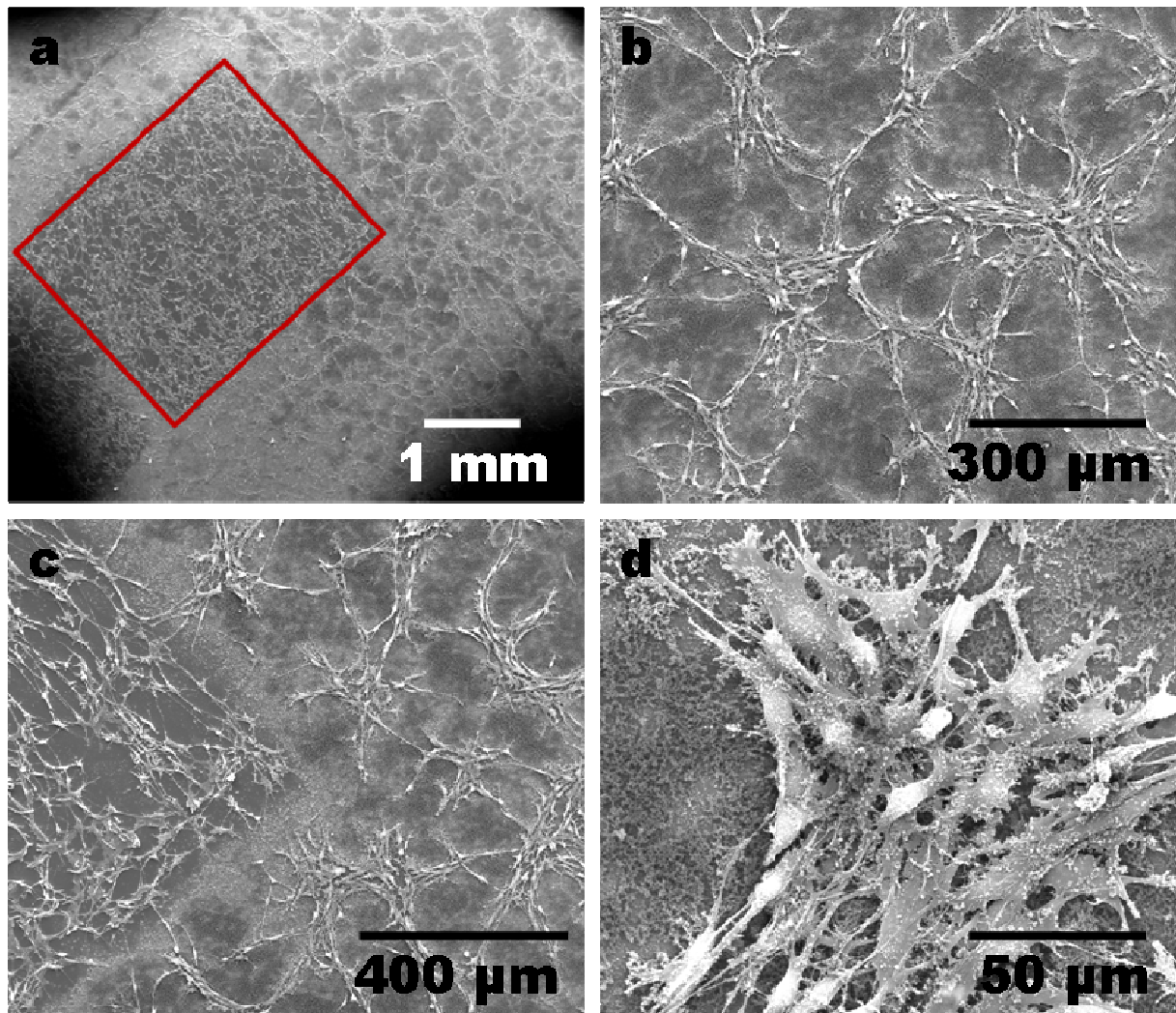


Abbildung 63: REM-Aufnahmen der Substrate nach den Zellexperimenten auf strukturierten und unstrukturierten Schichten aus PVP-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Die Untersuchung der getemperten Substrate im Auflichtmikroskop unterschied sich prinzipiell nicht von den ungetemperten Substraten. Im Elektronenmikroskop sollte jedoch ein deutlicher Unterschied sichtbar werden. Die Beschichtung mit den Nanopartikeln hatte sich komplett in eine poröse Mikrostruktur aus Apatit umgewandelt.

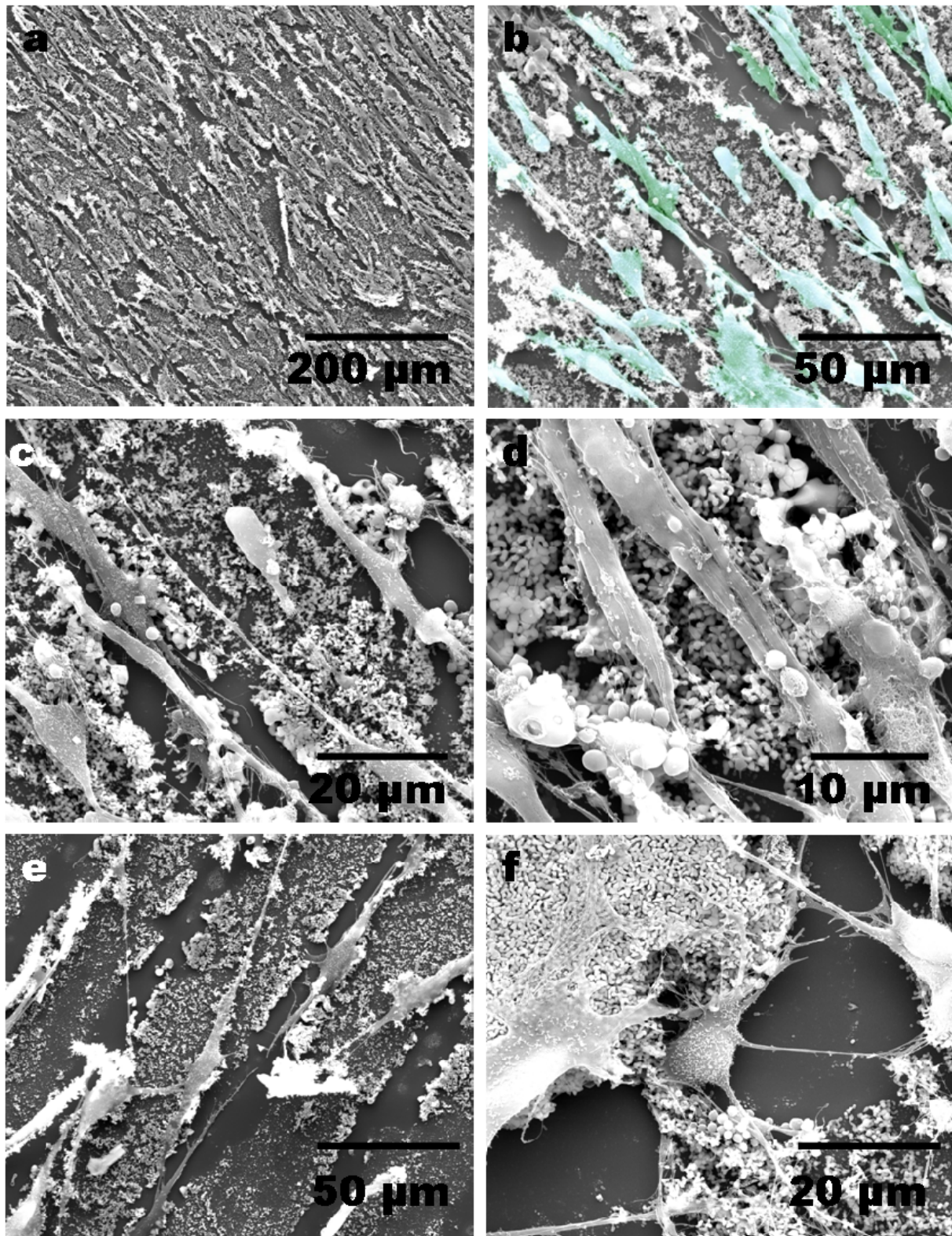


Abbildung 64: REM-Aufnahmen der getemperten Probe nach den Zellexperimenten. Die Zellen haben sich entlang der Laserstruktur ausgerichtet. Zur besseren Visualisierung wurden in Bild b die Zellen grün koloriert.

Im Gegensatz zu den ungetemperten Substraten war aber hier der Bereich der Laserstrukturierung erhalten geblieben. Deutlich lassen sich auf den Aufnahmen die elongierten Zellen erkennen. Nahezu alle Zellen haben sich anhand der linearen Struktur ausgerichtet. Die Zellen in Abbildung **64b** wurden grün koloriert, um den Kontrast zu der Beschichtung deutlicher hervortreten zu lassen. Hierbei wird klar sichtbar, dass sich nicht nur die Zellen in den Gräben, sondern auch die Zellen in den 46 µm breiten Zwischenräumen parallel zu den Gräben elongiert haben. Die Aufnahme **64d** zeigt bei 6000-facher Vergrößerung sehr deutlich die elongierten Zellen auf der mikroporösen Apatitstruktur. Auch dies ist ein Zeichen für interzelluläre Kontakte, über die Zellen miteinander Informationen austauschen, die Einfluss auf das Adhäsionsverhalten haben.

3.6.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen

Die Ergebnisse aus den Zellexperimenten entsprechen den erwarteten Resultaten und stehen im Einklang mit bekannten Daten aus vielfältigen Publikationen über Zelladhäsionen auf mikrostrukturierten Substraten. Neu ist hierbei die mikrostrukturierte Oberfläche einer nanopartikulären Beschichtung. Die Art der Beschichtungstechnik ermöglicht weitergehende Experimente im Hinblick auf die Beladung der Nanopartikel mit Wirkstoffen und bioaktiven Substanzen wie DNA. Abbildung **65** fasst noch einmal die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zusammen. Die Bilder der Reihe **65A** sind aus dem laserstrukturierten Bereich aufgenommen. Bild **65A1** wurde nach 24 Stunden, **65A2** nach 36 Stunden und **65A3** nach 48 Stunden aufgenommen. Die Ausrichtung der Zellen ist auch nach 48 Stunden noch erkennbar, obwohl sich die Zellen stark vermehrt haben und nun in Multilagen angeordnet sind. Die Aufnahmen der **65B**-Reihe stammen aus einem nichtstrukturierten Bereich. Die Ausrichtung der Zellen ist wahllos statistisch, und nach 48 Stunden ist auch hier eine deutliche Vermehrung der Zellen zu erkennen. Eine Ordnung ist nicht feststellbar.

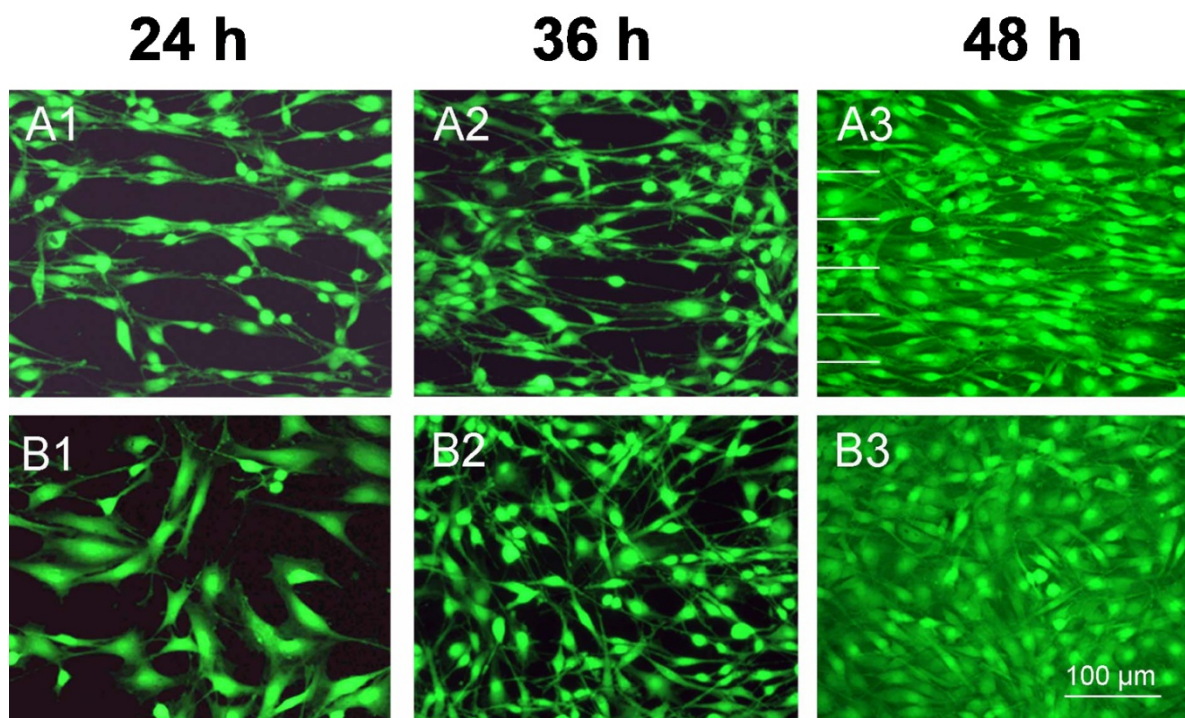


Abbildung 65: Fluoreszenzaufnahmen von MC3T3-E1 Zellen auf linear strukturierten Calciumphosphat-Nanopartikel Schichten (A) und auf unbeschichtetem Silicium (B) [202].

Diese Möglichkeit der Laserstrukturierung ist selbstverständlich nicht auf bloße Linien beschränkt. Der Stepper-Motor lässt sich entlang der x-y-Achse bewegen und ermöglicht so auch, auf dem Substrat zu „schreiben“. In diesem Experiment wurde der Schriftzug „UNI Duisburg-Essen CaP-Laser“ in eine Schicht aus Calciumphosphat-Nanopartikel eingebracht. Da dieser Bereich auf dem Substrat sehr breit war, konnte er nicht komplett durch eine Aufnahme erfasst werden. Die Abbildung 66 ist ein Zusammenschnitt aus vier Einzelaufnahmen, um sie für einen Betrachter lesbar zu machen. Auch hier lässt sich aus näherer Betrachtung eine Ausrichtung der Zellen erkennen. Die deutliche grüne Fluoreszenz der Buchstaben ist aber nicht nur auf einen hohen Anteil an Zellen in den Gräben zurückzuführen, sondern auch auf einer Reflektion des Lichts aus den Gräben selbst, wo das plane Silicium nach der Laserstrukturierung freiliegt.

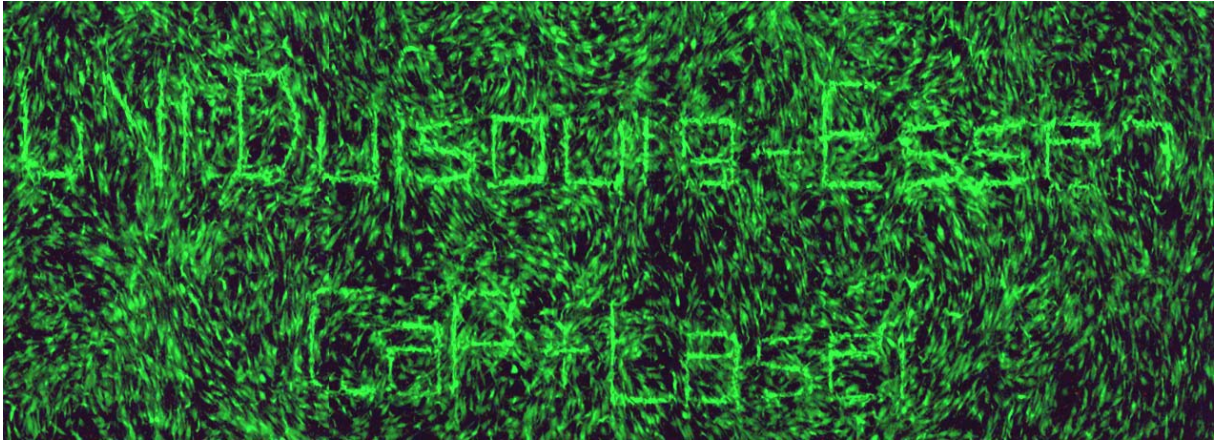


Abbildung 66: „UNI Duisburg-Essen“ Schriftzug, per Laser in eine Calciumphosphat-Schicht eingebracht und mit Zellen besiedelt. Die Zellen richten sich hier ebenfalls entlang der Gräben aus. Das Bild ist ein Zusammenschnitt aus mehreren Einzelaufnahmen.

Ähnliche Resultate für eine mikrostrukturierte Siliciooberfläche wurden von Wang et al. für MC3T3 Zellen bereits beschrieben [217]. Die Funktionalisierung der Partikel mit PVP hatte keinerlei Einfluß auf die Vitalität der Zellen. Eine Giftigkeit für diese Substanz wurde von Wang et al. bereits untersucht [123]. Er stellte fest, dass PVP in Zellkulturen nur im Bereich von mehreren gew. % in Lösung letale Auswirkungen auf die Zellen hatte. Der Anteil von PVP lag hier ja nur bei 1-2 %, bezogen auf die Calciumphosphat-Nanopartikel. In der gesamten Suspension lag der Anteil dann noch weit darunter.

3.7 DNA-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel als Basis für eine Implantatbeschichtung mit transfizierenden Eigenschaften

Die Möglichkeit, mit DNA funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel zur Transfektion zu nutzen ist neben weiteren Methoden unlängst publiziert worden [92, 126, 221, 222]. Der Vorteil eines Systems zur Transfektion, auf Basis von Calciumphosphat, ist die hohe Verträglichkeit dieser Partikel gegenüber Zellen. Nanopartikel aus Cadmiumselenid (Cd/Se-Nanopartikel) sind einheitlicher und kleiner als die hier dargestellten Calciumphosphat-Nanopartikel. Nichtsdestotrotz ist es vom Ansatz her zu verwerfen, hochtoxische Materialien wie Cadmium in einen Organismus einzubringen. In einer *in-vitro*-Kultur befinden sich nur wenige Zelltypen. Ein menschlicher Organismus besteht zum Beispiel aus ca. 220 differenzierten Zelltypen. Jeder dieser Zelltypen reagiert anders auf die Konzentration eines Giftstoffes. Bedingt durch diese Erschwernis ist es von vorne herein besser solch einen Stoff für die Nanopartikel zu wählen, der auch als Bulk-Material keinerlei Giftigkeit aufweist [87, 128, 159, 223-230].

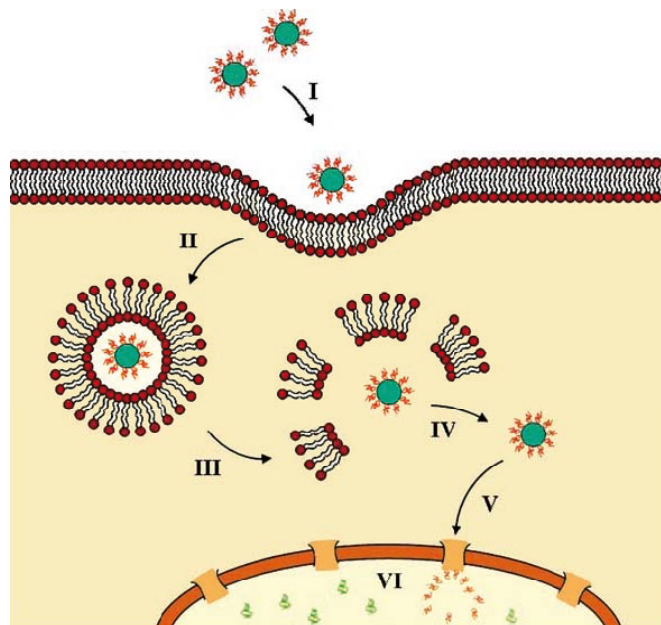


Abbildung 67: Modelldarstellung der Transfektion [92]

Die Möglichkeiten, um DNA in eine Zelle zu bringen sind vielfältig. Die Frage, um die es geht, ist, wie bringen wir die Partikel zu den gewünschten Zellen? Die Möglichkeit Suspensionen oder Dispersionen zu injizieren ist eine Möglichkeit. Diese Methode ist allerdings sehr ungerichtet. Die Injektion in ein spezielles

Gewebe (Muskel), ein spezielles Organ (z.B. Pankreas) ist relativ begrenzt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass transfizierende Partikel in Bereiche des Organismus kommen, wo eine Transfektion nicht gewünscht ist. Eine Injektion in die Blutbahn würde das Agens auf den gesamten Organismus verteilen. Für eine lokale Gentherapie wäre die Immobilisierung von solchen Partikeln eine interessante Alternative. Zur Immobilisierung bot sich die Abscheidung auf metallischen Oberflächen, namentlich Titan an. Eine solche Schicht könnte dann die Zellen transfizieren, die direkten Kontakt mit der Oberfläche haben. Zellen im Medium, die keinen Kontakt zu der Beschichtung, also den DNA-funktionalisierten Nanopartikeln haben, sollten auch nicht transfiziert werden. Jessel et al. berichteten 2006 über ein erfolgreiches System zur Transfektion auf Basis von Polyelektrolyt-Multilayern [231]. Hierbei war die DNA in der Schicht enthalten; ein ebenfalls simples und kostengünstiges Verfahren zur lokalen Gentherapie. Im Gegensatz zu dem hier beschriebenen Ansatz wird dort aber eine wesentlich höhere Zahl an verschiedenen Polymeren für die Polyelektrolytschicht verwendet. Ein noch simpleres System wären die Calciumphosphat/DNA Kolloide. Denkbar wäre hierbei eine Anwendung in der Implantatmedizin. Nach der Transplantation würden die Knochenzellen auf dem Implantat durch die Gentherapie zu den gewünschten Expressionen von Proteinen angeregt werden. Weiterhin wäre es vorstellbar, ein Implantat zur Therapie von Diabetes in den Pankreas einzubringen. Die Zellen des Pankreas könnten durch die Therapie wieder zur normalen Produktion von Insulin gebracht werden. Nach einer definierten Zeit ließe sich das Implantat wieder entfernen und müsste nicht im Organismus verbleiben, wie ein dauerhaftes Implantat zur kontrollierten Wirkstofffreisetzung.

3.7.1 Beschichtung von Siliciooberflächen mit DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln

Die Synthese der DNA-funktionalisierten Kolloide erfolgte wie in der Literatur beschrieben [143]. Die resultierenden 1,5 mL Dispersion lagen noch in wässriger Phase vor. Um die elektrophoretische Abscheidung zu ermöglichen, wurde das Wasser in vier Zentrifugationsschritten gegen Ethanol ausgetauscht. Die DNA, die nicht an der Partikeloberfläche adsorbiert war, sollte im Wasser gelöst nach der ersten Zentrifugation der Partikel mit dem Solvent entfernt werden. Nach jeder Zugabe von 1,5 mL Ethanol im Waschzyklus wurde es 15 min im Ultraschallbad redispergiert. Anschließend erfolgte die erneute Zentrifugation. Nach viermaligem Waschen wurde eine Dispersion erhalten, die zumindest zeitweise stabil blieb und auch bei der Elektrophorese keinerlei Zersetzung von Wasser zeigte, was sich an einer Blasenbildung hätte bemerkbar machen müssen. Um im Elektronenmikroskop die Partikel und Zellen gut sichtbar machen zu können, wurde eine polierte Siliciooberfläche (Wafer) als Trägermaterial ausgewählt. Eine p-Dotierung ermöglichte eine gute Polarisierbarkeit des Substrats. Die Zellexperimente wurden von A. Kovtun am Institut für Biochemie bei Prof. Dr. R. Heumann an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Nach den Zellexperimenten wurden die Zellen mit Glutaraldehyd fixiert, in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Aceton dehydriert und anschließend im Kritisch-Punkt-Verfahren getrocknet.

Die optische Kontrolle der Substrate nach der Beschichtung offenbarte schon eine unvollständige Belegung der Oberfläche mit den Kolloiden. Nach wenigen Minuten waren in der Dispersion im Stahlbecher schon Flocken erkennbar. Eine weitere Abscheidung aus diesem Ansatz war damit nicht mehr möglich. Die Stabilität der Dispersion reichte somit nur für zwei oder drei Plättchen pro Ansatz aus. Eine Erklärung für die unzureichende Stabilität der Dispersion findet sich in der Dynamischen Lichtstreuung. Die wässrige Dispersion neigt zu Agglomeraten im Bereich von 200-300 nm. Die hohe negative Ladung der Partikel, die im Zetasizer über das Zeta-Potential bestimmt wurde, sollte eigentlich für eine stabile Dispersion sprechen. Da die Partikel aber agglomeriert waren, war die Berechnung des Zetapotentials nicht korrekt, da zur Berechnung der tatsächliche Partikeldurchmesser bekannt sein musste. Dieser wurde vorher schon vom Gerät automatisch und damit falsch bestimmt. Das Zeta-Potential der Partikel war sicherlich negativ, aber weitaus geringer als

vom Gerät angegeben. Ähnliche Resultate fanden sich auch für die PEI-funktionalisierten Partikel.

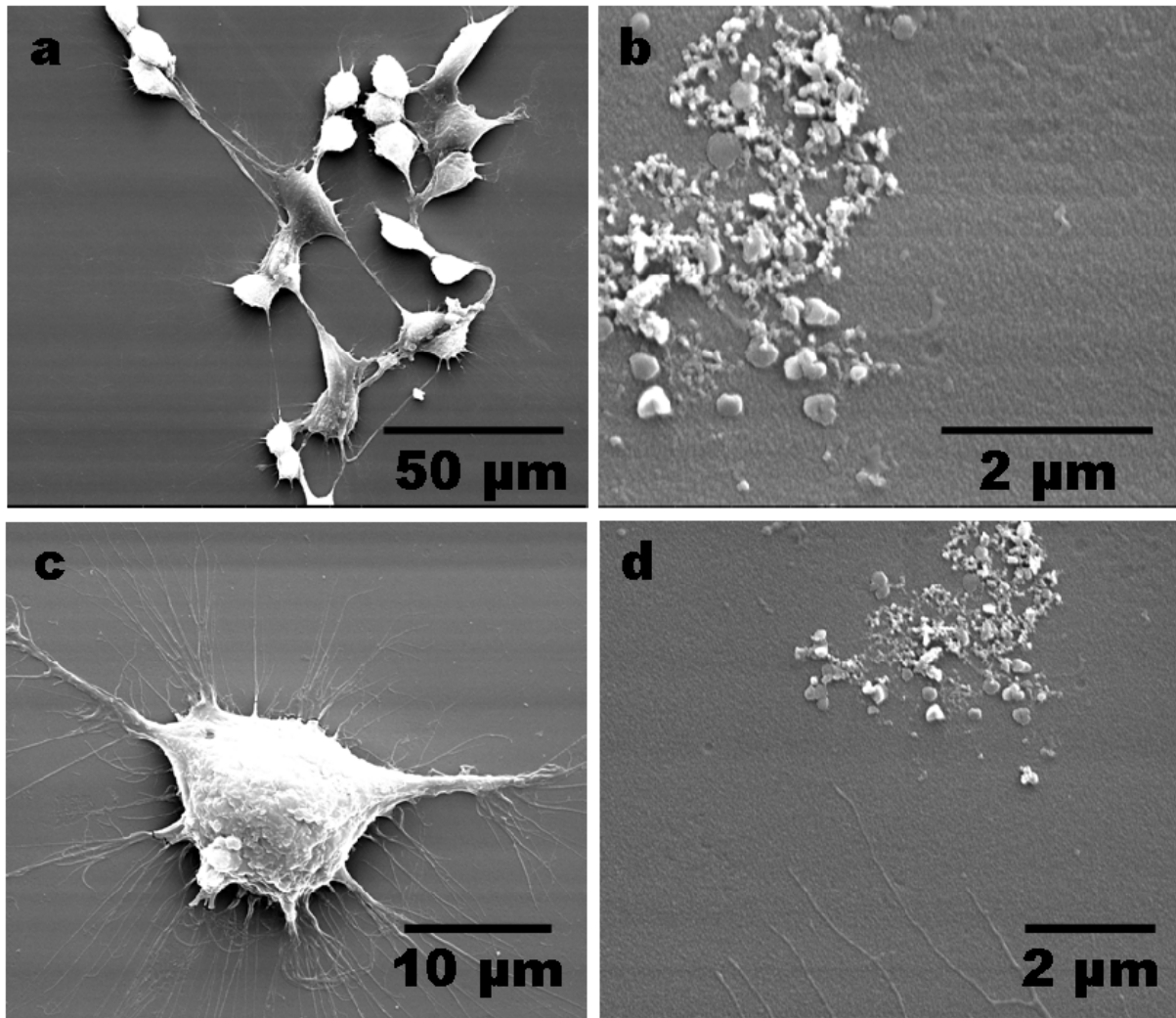


Abbildung 68: REM-Aufnahmen von Fibroblasten auf einem Siliciumträger, beschichtet mit DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln

Die Auswertungen der REM-Aufnahmen ergeben ein Bild, wie es schon zuvor mit den Laserstrukturierten Proben für einen anderen Zelltyp erhalten wurde. Die Zellen der NiH3T3-Linie adhärieren auf der Oberfläche des Siliciums und bilden zahlreiche Filopodien aus (Abbildung 68c). Sie spreiten aber nicht so weit wie die Zellen der MC3T3-E1-Linie. Vereinzelt finden sich auf dem Substrat auch Ansammlungen von Kolloiden (68b und 68d). Einzelne Filopodien der Zelle reichen auch bis an diese heran. Auf den Zellen fanden sich keine Partikel, die auf die DNA-Calciumphosphat-Nanopartikel schließen lassen. Die Größe der Kolloide liegt bei den Primärpartikeln wie erwartet bei ca. 80 nm. Einige größere Agglomerate sind ebenfalls zu erkennen. Da das Silicium als Träger für eine Implantatbeschichtung nur als Modell gedient hat, wurden hierzu keine

Versuche unternommen, die Beschichtung zu verbessern. Stattdessen wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, Titanbleche mit den DNA-funktionalisierten Partikeln zu beschichten, um ein Modellsubstrat zu benutzen, das näher an einem realen Implantat war.

3.7.2 Beschichtung von Titanoberflächen mit DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln

Zur Beschichtung der Titansubstrate wurden die Kolloide analog der Beschreibung in 3.7.1 hergestellt. Die optische Betrachtung der Substrate nach der Beschichtung ergab ein ähnliches Bild. Die Substrate wirkten fleckig und unregelmäßig beschichtet. Die Untersuchungen im REM (Abbildung 69 a) zeigten deutlich die unregelmäßige Schicht, die nur einen Teil bedeckt. Das Ganze wirkte wie einige zufällig platzierte Flecken auf dem Substrat. Eine höhere Vergrößerung (Abbildung 69 b und c) zeigte aber gut den nanopartikulären Aufbau dieser Flecke. Die Partikel wirkten locker und nicht verklebt. Dies ließ somit erwarten, dass die Zellen einige dieser Partikel aufnehmen können.

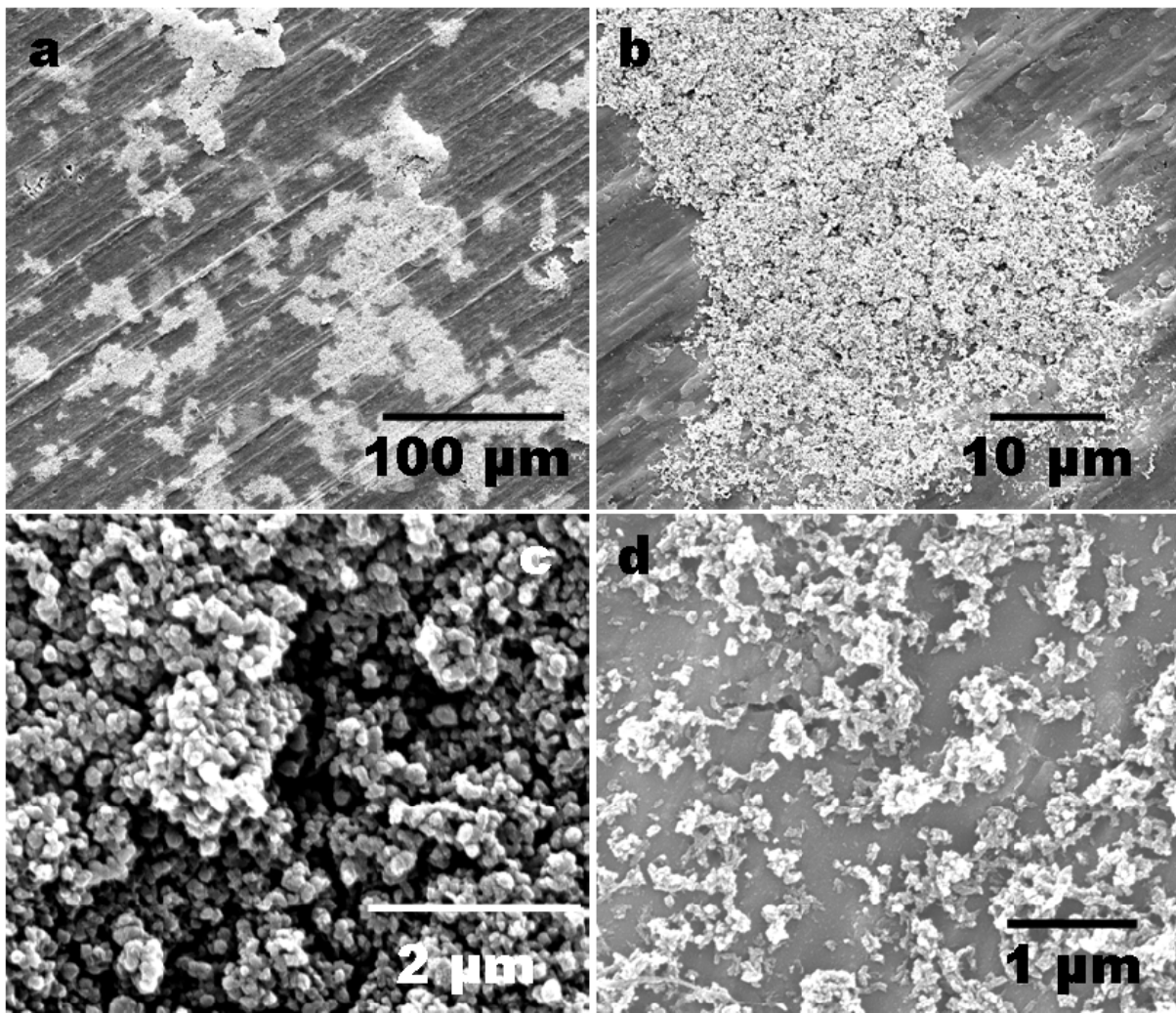


Abbildung 69: REM-Aufnahmen von einem Titansubstrat nach der elektrophoretischen Beschichtung mit DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln.

Offensichtlich ist die Abscheidung von DNA-funktionalisierten Kolloiden nur sehr schwer zu bewerkstelligen. Die Gründe für dieses Ergebnis liegen wohl in der unzureichenden Funktionalisierung mit DNA. Diese kann alleine die Partikel nicht ausreichend stabilisieren, weder sterisch noch elektrostatisch. In der Dispersion finden sich deshalb nur größere Agglomerate, die dann auch als Agglomerat abgeschieden werden. Zur Verbesserung der Dispersion könnte man noch dazu übergehen, ein Lösungsmittel mit höherer Viskosität zu wählen. Dies könnte die resultierenden Dispersionen stabiler machen. Hier liegt aber auch die Beschränkung vor, dass das Lösungsmittel die DNA nicht denaturieren darf. In alkoholischen Lösungen ist die DNA zwar nicht löslich, wird aber auch nicht irreversibel denaturiert.

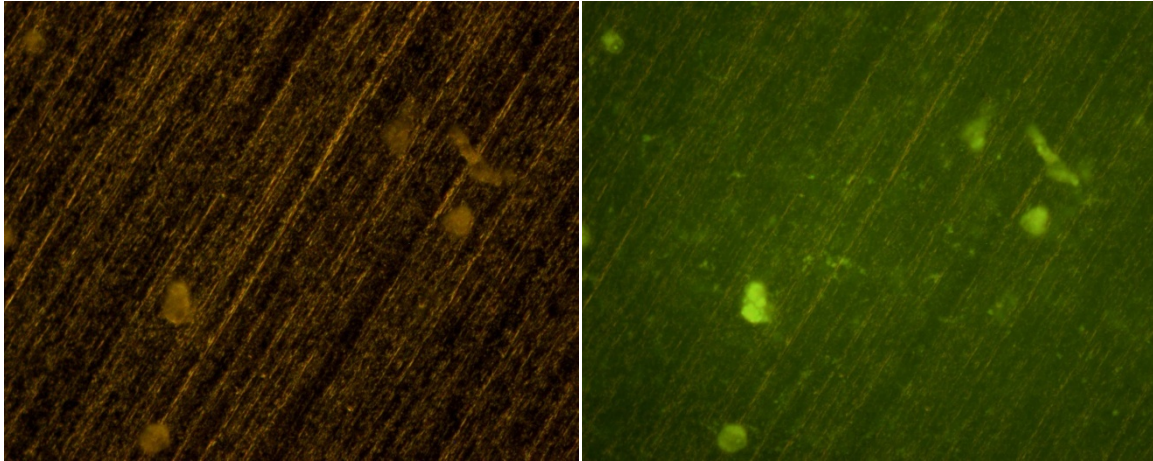


Abbildung 70: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NiH3T3-Zellen auf Titansubstraten

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen erfreulicherweise grün fluoreszierende Zellen auf den Substraten. Abbildung **70** zeigt links einen Bereich des Substrats mit einigen Zellen im Auflicht, rechts daneben derselbe Ausschnitt in Fluoreszenzlicht. Es ist ersichtlich, dass diese Zellen erfolgreich transfiziert wurden. Weitere Betrachtungen ergeben aber nur eine geringe Effizienz der Transfektion. Es ist natürlich nur für die Zellen möglich die Partikel aufzunehmen, die auch zufälligerweise auf einem beschichteten Bereich beim Aussiedeln adhäriert haben. Die vier REM-Aufnahmen in Abbildung **71** zeigen einige Zellen, die auf einem solchen Bereich adhäriert haben. Morphologisch unterscheiden sich diese Zellen nicht von den Zellen, die auf der reinen Titanoberfläche gewachsen sind.

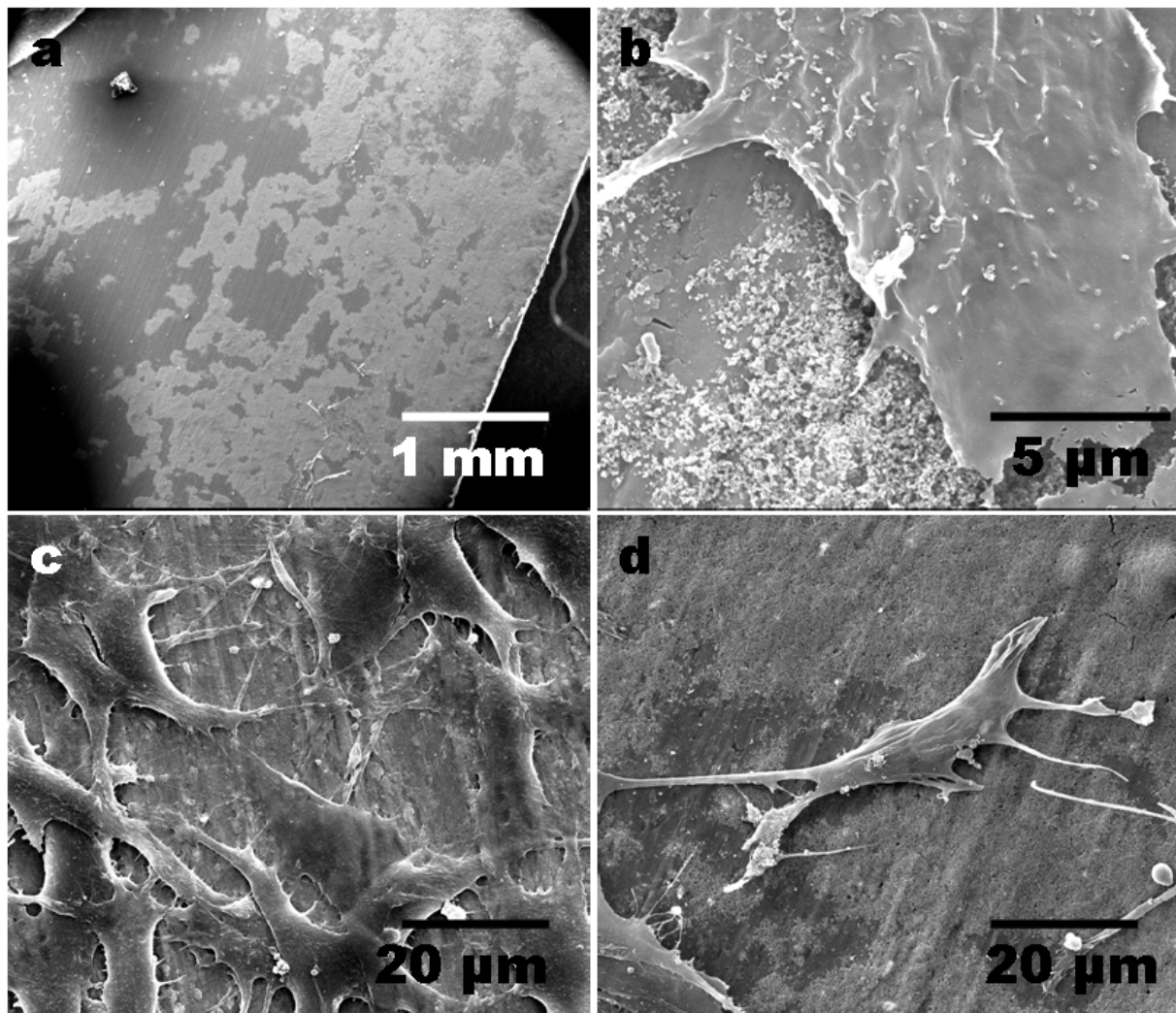


Abbildung 71: REM-Aufnahmen von elektrophoretisch beschichteten Titansubstraten mit DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach Besiedelung mit NiH3T3-Zellen

Interessant wäre es herauszufinden, inwieweit sich durch ein Elektronenmikroskop die Theorie der Endozytose der Partikel stützen ließe [92, 124, 232-237]. Hierzu wurden einige Zellen mit höchst möglicher Vergrößerung betrachtet. Die Zellen erwiesen sich nach der Kritisch-Punkt-Trocknung und anschließender Plasmabeschichtung mit Gold/Palladium-Legierung als ausreichend stabil gegenüber dem Elektronenstrahl. Eine Beschleunigungsspannung von 30 kV verursachte bei den Proben keine Schäden. Bei dieser Beschleunigungsspannung lassen sich die Proben auf das bis zu 240000-fache scharf abbilden. Die bei dieser Vergrößerung gemachten Aufnahmen offenbaren eine Vielzahl an Partikeln auf den Zelloberflächen. Warum sich Partikel auf den Zellen befinden, lässt sich bei der Betrachtung des Zellverhaltens finden: hierbei bewegen sich die Zellen über verschiedene

Mechanismen auf der Oberfläche eines Substrats fort. Die Filopodien enthalten an ihren Spitzen die fokalen Adhäsionen, die an der Substratfläche haften. Beim Wandern der Zelle müssen sich diese wieder lösen, doch zunächst werden diese elongiert. Erst wenn die Kraft zu stark wird, reißen sie von der Oberfläche ab und ziehen sich wieder zurück. Die dabei an den Filopodien haftenden Partikel werden so zum Zellkörper gezogen. Die REM-Aufnahmen in Abbildung **72a-d** zeigen verschiedene Bereiche der Zellkörper mit den Partikeln. Die gesamte Oberfläche der Zellen wirkt porös und von Löchern durchsetzt. Die Partikel heben sich aber deutlich davon ab. Die nachträgliche Kolorierung von Abbildung **72d** hebt den Kontrast zwischen der grün kolorierten Zellmembran und den blauen Partikeln sehr deutlich hervor. Dies macht klar, dass dies wirklich die Partikel sind und nicht etwa ein Präparationsartefakt. Für eine EDX-Analyse sind diese Bereiche aber zu klein um einen Beweis zu erbringen, dass es sich bei diesen Partikeln um Calciumphosphat handelt. Hauptsächlich würden Kohlenstoff und Sauerstoff aus der Zellmembran auftauchen. Im Vergleich mit Zellen auf Substraten, auf denen keine Nanopartikel abgeschieden wurden (siehe Abbildung **5**), finden sich bei diesen Zellen keine ähnlichen Partikel auf der Zelloberfläche. Aus diesem Bildabgleich lässt sich somit die Schlussfolgerung ziehen, dass es sich bei diesen Partikeln nur um die eingesetzten Nanopartikel handeln kann. Da sich so viele Partikel auf der Oberfläche befinden, ist anzunehmen, dass zumindest einige den Weg in das Zellinnere über die Endozytose gefunden haben.

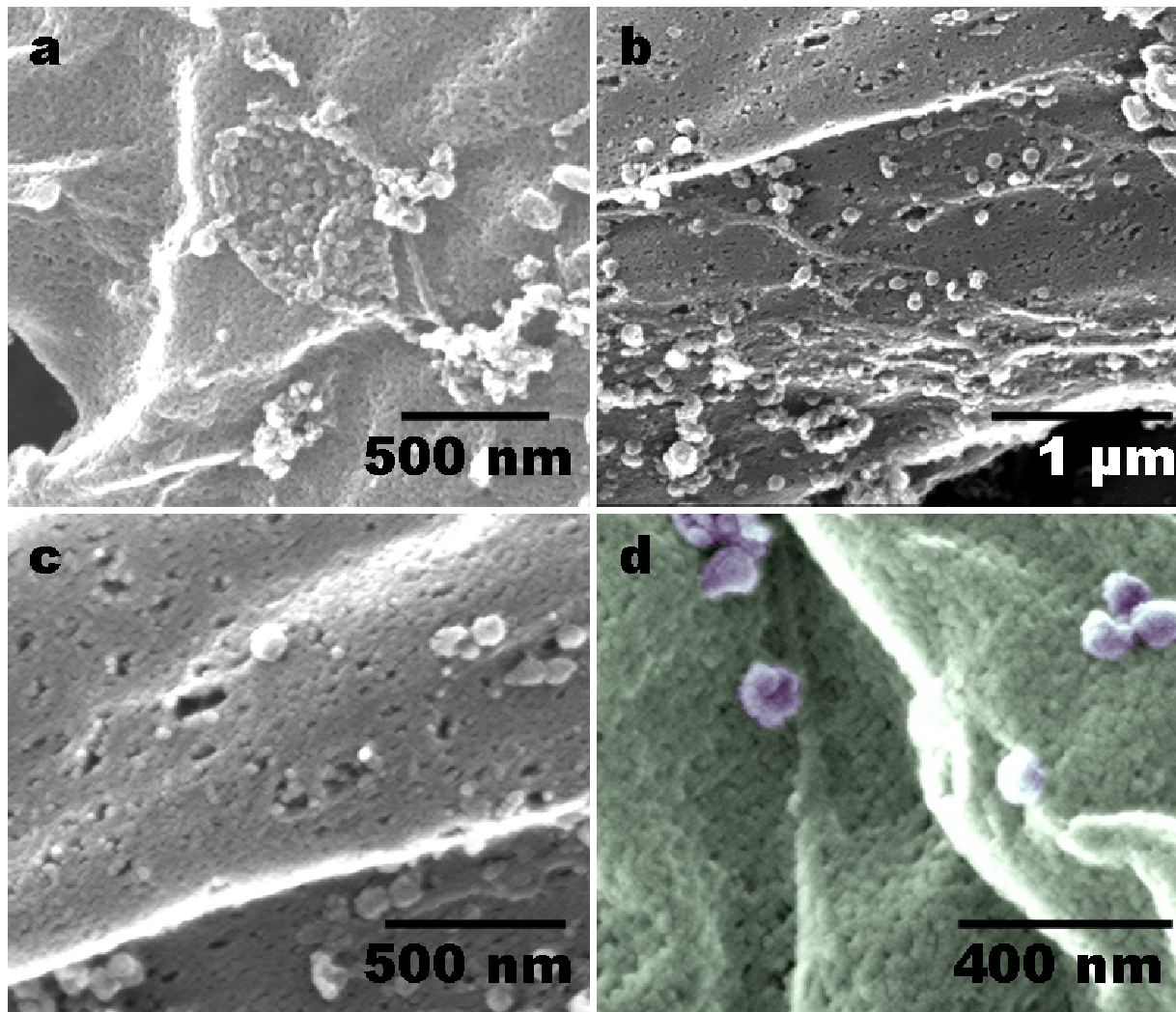


Abbildung 72: REM-Aufnahmen von DNA-funktionalisierten Nanopartikeln auf NiH3T3-Zellen. Gut erkennbar ist die poröse Zelloberfläche. Die Nanopartikel in Bild d wurden blau, die Zellemembran grün koloriert.

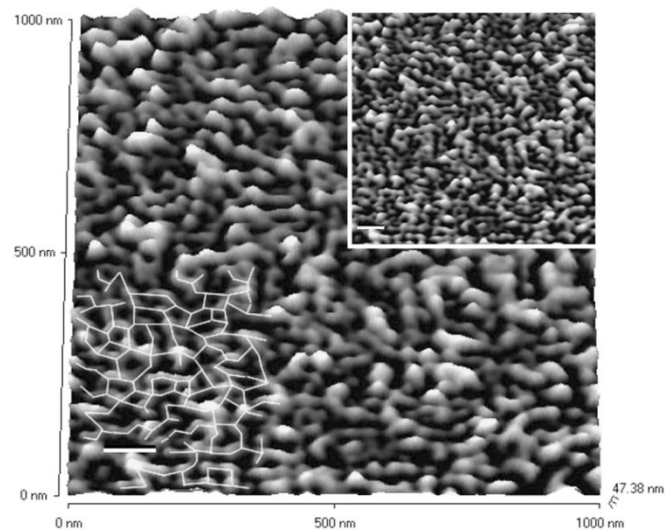


Abbildung 73: AFM-Aufnahme einer Erythrozyten-Membran unter physiologischen Bedingungen [238].

Um die Strukturen auf der Zelle zu erklären, ist es nötig, mit bekannten Aufnahmen der Literatur zu vergleichen. Von Swihart et al. wurden die Oberflächen von Erythrozyten unter physiologischen Bedingungen im AFM untersucht. Da hierbei keinerlei weitere Präparation nötig war, kann nahezu ausgeschlossen werden, dass sich ein Präparationsartefakt eingeschlichen hat. Die Möglichkeit, unter Wasser zu arbeiten, ist hierbei ein entscheidender Vorteil des AFM gegenüber dem REM. Die von Swihart publizierten Daten (Abbildung **73**) zeigen ebenfalls eine sehr raue Oberfläche der Zellen. Die Auflösung der Oberflächentopographie ist etwas feiner als die hier erzielten Ergebnisse. Die Daten stimmen aber bei näherer Betrachtung gut miteinander überein. Somit kann man die Aussage treffen, dass in diesem Fall wirklich die Oberfläche der Zellmembran sichtbar gemacht wurde und damit auch die Partikel auf der Oberfläche. Die Verwendung von einem Gold/Palladium-Target im Bedampfer sollte auch eine nur 2-3 nm dicke Schicht auf der Probe erzeugen. Dies ist viel weniger als mit reinem Gold zu erzielen wäre. Cluster dieser Größenordnung lassen sich mit einem REM kaum abbilden.

3.7.3 Beschichtung von Titan mit PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln als Akzeptoren für DNA zur Transfektion

Es gibt in der Literatur mehrere beschriebene Verfahren, um aus PEI und DNA eine Lösung zu erstellen, die transfizierende Eigenschaften aufweist [68, 88, 102]. Die beschriebenen Verfahren sind jedoch teilweise unklar im Hinblick auf das entstandene Transfektions-Agens. Ein elektrostatisches Addukt aus positiv geladenem PEI und negativ geladener DNA ist dabei anzunehmen [87]. Die Charakterisierung und Beschreibung eines solchen Agglomerats ist aber schwierig. Mit mikroskopischen Techniken lässt sich ein solches Polymerknäuel nicht nachweisen. Durch den Streukontrast in der Dynamischen Lichtstreuung können Daten über Molekulargewicht und Radius des Addukts gefunden werden. Der Nachteil dieser Technik ist die schädliche Wirkung von PEI auf Zellen. Es scheint aber sicher zu sein, dass erst größere Mengen an PEI zytotoxisch wirken [87].

Dieser Ansatz ging nun dahin, PEI-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel zu verwenden. Dass sich diese Partikel gut aus alkoholischen Solventien abscheiden lassen, wurde bereits gezeigt. Wenn man nun eine DNA Lösung auf so beschichtete Titansubstrate auftröpfelt, sollte sich die DNA an die Polymerschicht auf den Partikeln elektrostatisch anbinden. Mit der Aufnahme der Nanopartikel in die Zelle sollte so auch die DNA aufgenommen und in das Erbgut eingebaut werden. Die Effizienz dieses Verfahrens sollte sich leicht im Lichtmikroskop durch leuchtende und nicht leuchtende Zellen errechnen lassen. Des Weiteren wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, um herauszufinden inwieweit die Zellen auf diesen Substraten adhärieren. Weiterhin können morphologische Daten über die Beschichtung im Allgemeinen erhalten werden.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung **74** zeigen ein beschichtetes Titansubstrat nach den Zellexperimenten. Die Probe wurde wie gehabt Kritisch-Punkt-Getrocknet und mit Gold/Palladium-Legierung besputtert. Die Zellen adhärieren gut auf dem Substrat, die Beschichtung selbst ist mehrere μm dick und weist einige Trocknungsrisse auf. Im Vergleich zu den Calciumphosphat/DNA-Kolloiden stellt man fest, dass die Beschichtung etwas weniger porös erscheint. Dies beruht vermutlich auf der zugesetzten Menge DNA, die auf das Substrat aufgetropft und dann trocknen gelassen wurde. Da

die Menge an DNA zu viel war, um vollständig am Adsorbens zu binden, füllt sie die Lücken zwischen den Kolloiden aus. Da die DNA sich beim Trocknen auch noch zusammenzieht, führt dies zu einer weiteren Vergrößerung der Risse in der Beschichtung.

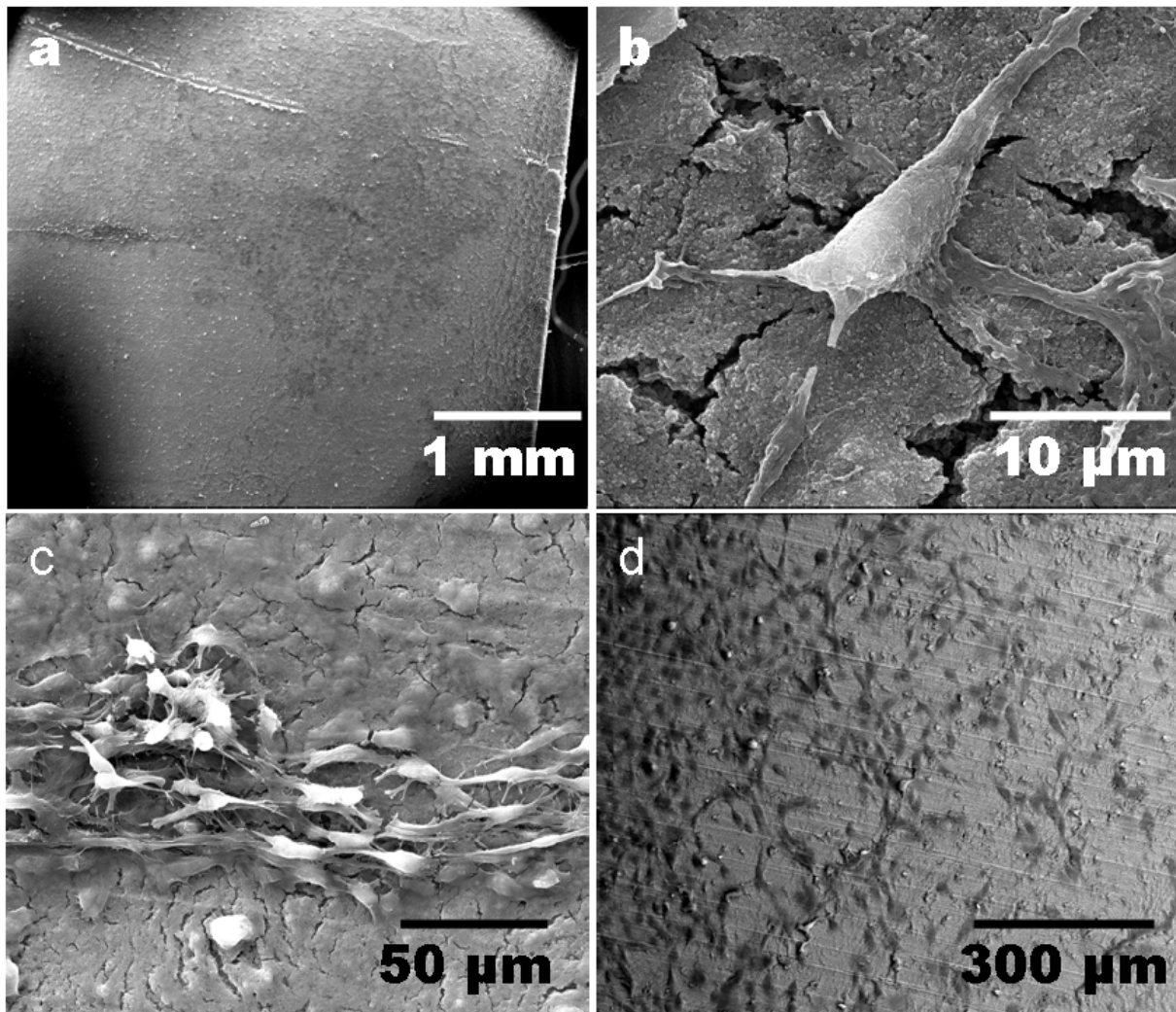


Abbildung 74: REM-Aufnahmen von NIH3T3-Zellen auf PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach der Zugabe von DNA auf die Schicht. Aufnahme d ist eine Darstellung des Rückstreubildes.

Insgesamt ergab die Auswertung der REM-Aufnahmen, dass die Zellen gut auf diesen Oberflächen adherierten. Die Fluoreszenzaufnahmen der Substrate in Abbildung 75 zeigten leider eine nur geringe Transfektionseffizienz. Es fanden sich zwar einige wenige Zellen, die grün fluoreszierten, der überwiegende Teil der Zellen wurde allerdings nicht erfolgreich transfiziert. Die Objekte auf diesen Aufnahmen, die eine geringe Fluoreszenz aufweisen, sind sehr wahrscheinlich Artefakte. Die Beschichtung aus Calciumphosphat neigt zusätzlich zu einer gewissen Autofluoreszenz, was den Kontrast der Aufnahme verschlechtert.

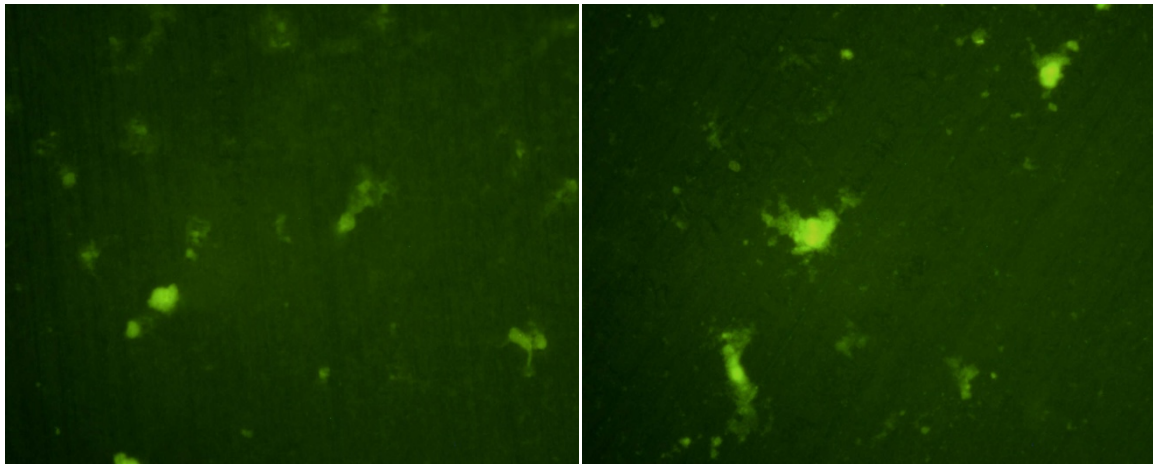


Abbildung 75: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von NiH3T3-Zellen auf PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln nach Zugabe von DNA.

Da diese Versuche nicht den gewünschten Effekt hatten, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit begonnen, ein kolloidales System zu erstellen, das sich besser handhaben lässt. Die Beschichtung der Substrate mit PEI-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln ist reproduzierbar möglich. Eine Lösung von DNA lässt sich ebenfalls μL -genau auftropfen. Die Schwierigkeit besteht dann aber darin zu zeigen, wieviel DNA tatsächlich auf der Oberfläche gebunden wurde. Inwieweit eine bestimmte Menge Partikel, eine bestimmte Menge DNA aufgenommen hat, und inwieweit das eine Rolle für eine bessere Transfektionseffizienz spielt, hätte ebenfalls bestimmt werden müssen. Die verwendeten Substrate (PEI-funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel elektrophoretisch auf Titanbleche abgeschieden) wurden mit verschiedenen Mengen an DNA versetzt. Ein Unterschied in der Menge der erfolgreich transfizierten Zellen konnte dabei nicht gefunden werden. Eine weitere Verfolgung dieses Ansatzes erschien so nicht vorteilhaft zu sein. Nichtsdestotrotz zeigten die Resultate in Übereinstimmung mit der Literatur, dass sich DNA und PEI zu einem reversiblen Komplex zusammenschließen können. Dabei ist es unerheblich, ob das PEI in Lösung vorliegt oder auf einem Adsorbens bereits gebunden ist. Wäre dies nicht der Fall, so hätte eine Transfektion nicht stattgefunden. Reine Plasmid-DNA in Lösung, die in einen Organismus eingebracht wird, kann von Zellen zwar aufgenommen werden; die Effizienz ist jedoch gering [239-245].

3.7.4 Transfizierende Beschichtungen aus zweischaligen PEI/DNA Calciumphosphat-Nanopartikeln

Da die Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel mit DNA alleine nicht zu stabilen Dispersionen führte, und die Beschichtungen mit PEI-funktionalisierten Kolloiden plus Auftropfen von DNA nur schlecht zu definieren waren, wurde ein neuer Ansatz weiterverfolgt. Hierbei wurden die Partikel zunächst mit PEI funktionalisiert. Eine wässrige Dispersion dieser Partikel wurde dann mit DNA-Lösung versetzt. Die aufgrund der PEI-Funktionalisierung positiv geladene Partikeloberfläche bindet elektrostatisch mit der negativ geladenen DNA. Über elektrostatische Wechselwirkungen dann gebundene DNA sollte so eine zweite Schicht auf den Kolloiden bilden. Dass eine Reaktion auftrat, konnte schnell an der sich bildenden Flockung und Sedimentation ausgemacht werden, was ein Hinweis auf eine Brückenflockung durch den DNA-Strang ist. Eine 30-minütige Behandlung dieser Dispersion im Ultraschallbad sollte die Reaktion abschließen. Die hiernach erhaltene wässrige Dispersion war aber auch nur wenige Minuten stabil. Nach kurzer Zeit trat erneut eine Agglomeration und Sedimentation der Dispersion auf. Um die elektrophoretische Abscheidung zu ermöglichen, wurde die Dispersion zentrifugiert und das Wasser in mehreren Schritten gegen Ethanol ausgetauscht. Nach jeder Zentrifugation wurde die Dispersion für 15 min im Ultraschallbad redispergiert. Die Stabilität der Dispersion wurde mit jeder weiteren Waschung erhöht. Nach fünf Reinigungsschritten war die Dispersion hinreichend stabil, um eine Abscheidung zu ermöglichen. Die Titansubstrate wurden dann bei 50 Volt 30 s lang beschichtet. Die resultierende Schicht hatte eine Dicke von etwa 1 μm (bestimmt durch REM-Aufnahmen). Optisch war die Beschichtung aufgrund der leicht weißen Farbe erkennbar. Weiterhin ließen sich keine größeren Risse oder Ungleichmäßigkeiten erkennen. Die Schicht unterschied sich somit in ihrer Qualität deutlich von den Schichten, die aus DNA-funktionalisierten Partikeln erhalten wurden. Zur Untersuchung der Transfektionseigenschaften wurden die Titansubstrate mit den NiH3T3-Zellen besiedelt, nach 24-stündiger Inkubationszeit im Fluoreszenzmikroskop untersucht und danach die Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie im FACS bestimmt (FACS: *fluorescence activated cell sorting*). Diese Untersuchungen am FACS wurden in Kooperation mit Prof. Dr. M. Köller an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

Die Aufnahmen in Abbildung 76 zeigen das mehr als positive Ergebnis. Nahezu alle Zellen fluoreszieren grün. Offensichtlich haben die Zellen auf der Oberfläche die Nanopartikel aufgenommen und das Gen erfolgreich eingebaut. Um dieses erste optische Resultat statistisch zu verifizieren, wurden mehrere Proben im FACS analysiert. Als Kontrollexperiment wurden mit PEI-funktionalisierte Nanopartikelschichten, ohne weiteren DNA-Zusatz, mit Polyfect versetzt. Hier zeigte sich eine erfolgreiche Transfektion bei einigen Prozent der Zellen (Abbildung 77). Inwieweit die Effizienz des Polyfect durch das PEI behindert wurde, konnte nicht näher bestimmt werden. Das Polyfect selbst ist ein Mittel zur Transfektion auf Basis eines Dendrimers. Die Ergebnisse der Transfektionsexperimente mit Polyfect und Zellen in Suspension wiesen in den vergangenen Experimenten einen Wert von ca. 12 % auf [126]. In vielen Arbeiten in der Literatur werden Mittel wie Polyfect oder Lipofect als Stand der Technik angewendet, um die eigenen Ergebnisse der Transfektion einzuordnen [68, 81, 95, 104, 113, 115, 118, 126, 134, 231, 246, 247]. Hierbei handelt es sich um vergleichende Studien der nicht-viralen Gentransfektion.

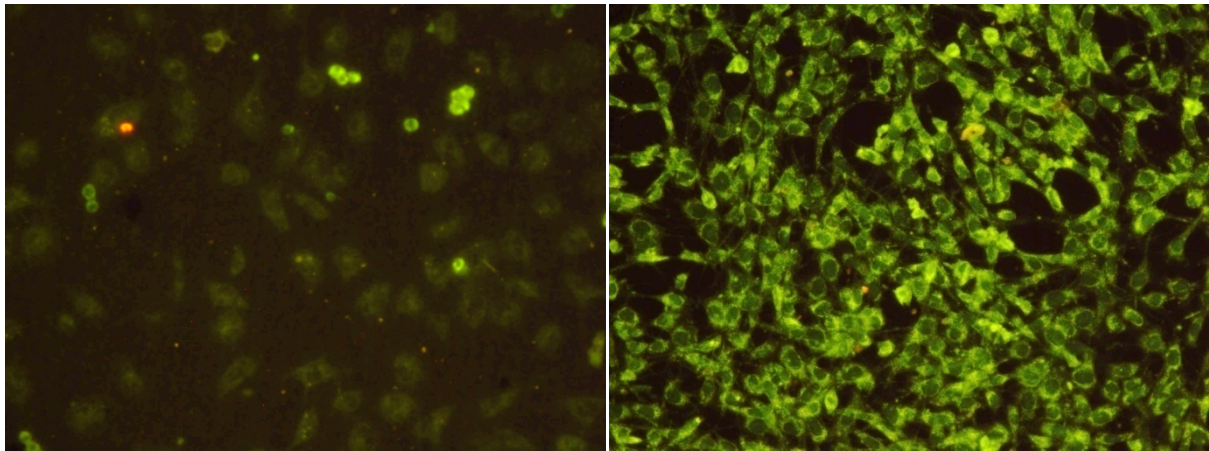


Abbildung 76: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von den mit PEI/DNA-funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikelschichten. Die erfolgreiche Transfektion nahezu aller Zellen auf dem Substrat tritt klar hervor.

In Abbildung 77 sieht man auf der linken Aufnahme die Zellen im Auflicht, die rechte im Fluoreszenzlicht. Die roten Pfeile markieren einige der grün leuchtenden Zellen, was eindeutig die geringe Transfektionseffizienz des Polyfect belegt.

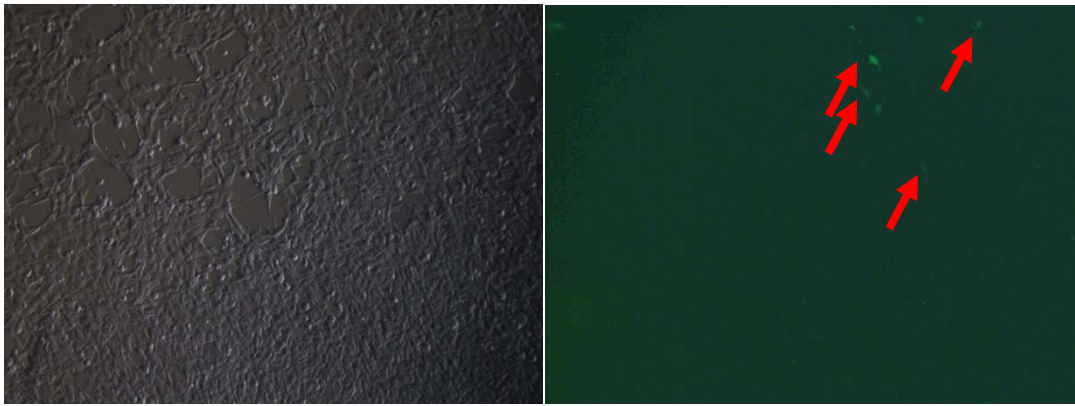


Abbildung 77: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Polyfect-Kontrolle in Aufsicht (links) und Fluoreszenz (rechts). Die Pfeile markieren erfolgreich transfizierte Zellen.

Der Vergleich mit der Polyfect-Kontrolle zeigt die Überlegenheit dieses neuen Systems gegenüber dem derzeitigen Stand der Technik, wobei natürlich gesagt werden muss, dass der Vergleich zwischen einem dispersen System wie Polyfect und einem immobilen System, wie dem hier entwickelten, etwas hinkt. Die Ziele der Anwendung beider Systeme sind nicht gänzlich identisch. Mit einer Dispersion lassen sich auch die Zellen transfizieren, die nicht adhären sind und im Medium schwimmen. Für die beschichteten Oberflächen gilt, dass die Zellen adhären sein müssen. Ohne einen Kontakt zur Oberfläche können keine DNA-beladenen Kolloide von den Zellen aufgenommen werden. Dazu müssten sich schon die Partikel von der Oberfläche lösen und durch Diffusion im Medium zu den Zellen gelangen. Des Weiteren kann ein disperses Transfektionsagens leichter angewendet werden. Eine Beschichtung muss erst aufwändig aufgebracht werden und die Zellen müssen nach erfolgreicher Transfektion auch wieder von ihrem Haftgrund gelöst werden. Natürlich ist es auch möglich, dass sich die Nanopartikel langsam aus ihrem Verbund in der Beschichtung lösen und Zellen transfizieren, die nicht in Kontakt mit der Oberfläche waren.

Bei der morphologischen Untersuchung im REM stand wieder die Frage nach dem Adhärenzverhalten der Zellen im Fokus, und ob sich erneut Partikel auf den Zellen finden würden. Die REM-Aufnahmen in Abbildung 78 zeigen deutlich die adhärenierenden Zellen auf der Schicht. Da die Oberfläche der Schicht keine Mikrostrukturierung aufweist, orientieren sich die Zellen wahllos in alle Richtungen. Man erkennt deutlich die fokalen Adhäsionen der Zellen, ihre Füße und Filopodien, die den Zellkörper auf der Oberfläche festhalten. Über lamellare Ausstülpungen, den Lamellopodien, bewegt sich die Zelle über den

Untergrund weiter. Zellen mit kugeliger Morphologie wurden auf dem Substrat nicht gefunden. Dies bedeutet, dass alle Zellen leben und nicht durch Substanzen aus der Schicht oder den Nanopartikeln selbst in ihren Vitalfunktionen beeinträchtigt sind. Auswirkungen von verschiedenen Oberflächentypen wurden in verschiedenen Arbeiten in der Literatur behandelt [47, 248-251]. Um eventuelle Stressfaktoren der Zellen ausschließen zu können, müssten verschiedene zellbiologische Proteinmarker analysiert werden, die auf solche schädlichen Reaktionen ansprechen. Dieser Punkt wäre ein Ansatz für weitere Arbeiten in der Zukunft an diesem System.

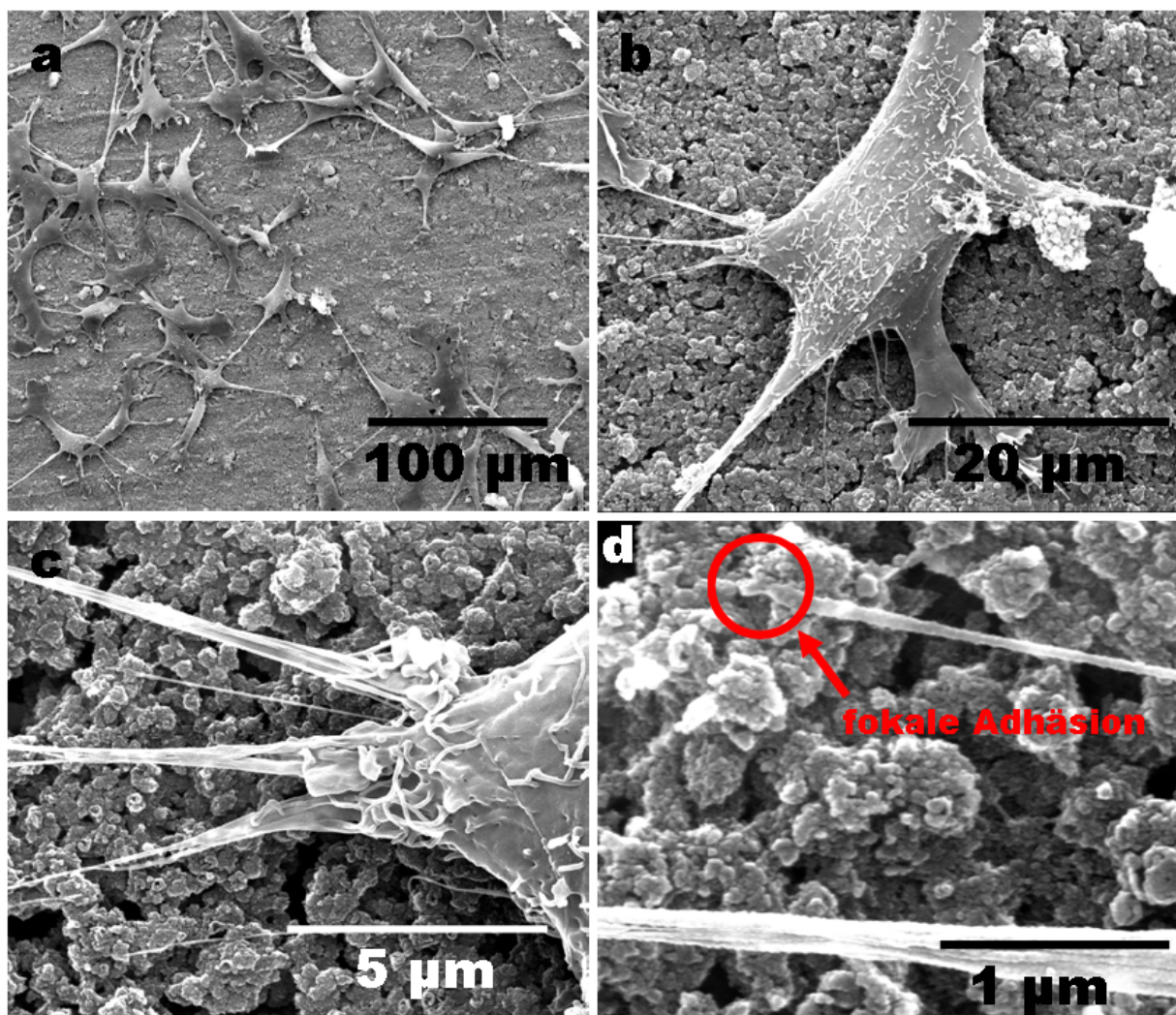


Abbildung 78: REM-Aufnahmen von NiH3T3-Zellen auf mit PEI/DNA-Kolloiden elektrophoretisch beschichtetem Titansubstrat. Deutlich erkennbar sind die Filopoden und die fokalen Adhäsionen (d).

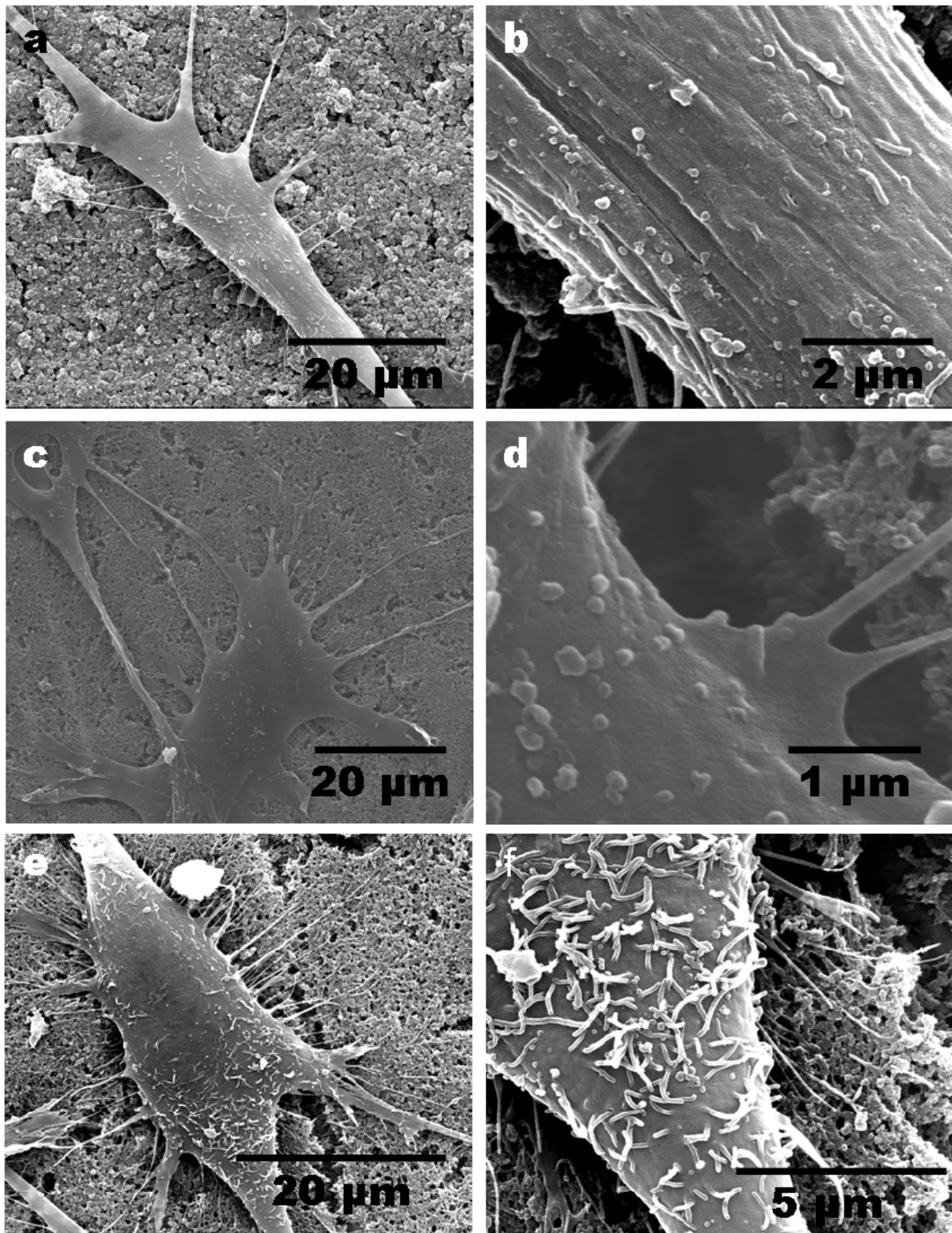


Abbildung 79: REM-Aufnahmen von drei NiH3T3-Zellen (links) mit Vergrößerung eines Teilbereichs des Zellkörpers mit den Kolloiden (rechts). Die Titansubstrate wurden ebenfalls mit PEI/DNA-Kolloiden elektrophoretisch beschichtet.

In Abbildung **79** sind in den linken Abbildungen (**a**, **c**, **e**) drei verschiedene Zellen auf der Nanopartikeloberfläche zu sehen. Die rechten Aufnahmen (**b**, **d**, **f**) zeigen einen vergrößerten Bereich der Zelloberfläche, auf dem einige einzelne Nanopartikel zu sehen sind; ein Zeichen dafür, dass die Zellen beim Umherwandern auf der Oberfläche des Substrats die Kolloide vom Untergrund aufnehmen. Auf der Zelloberfläche angelangt, erfolgt dann die Aufnahme über Endozytose.

Die Aufnahmen mit hoher Vergrößerung in Abbildung **80** zeigen einzelne Kolloide und vereinzelte Agglomerate auf der Zelloberfläche zwischen den Filopodien. Dies ist ein Beleg dafür, dass die Beschichtung nicht so fest an dem Substrat haften würde, als dass eine Zelle nicht Teile davon herauslösen könnte, was natürlich auch eine unmittelbare Voraussetzung für eine erfolgreiche Nanopartikel vermittelte Transfektion ist. Es ist schwierig, aus diesen Aufnahmen die Endozytose abzuleiten. Die sichtbaren Partikel auf den Zellen sind vermutlich nur kurz davor, in die Zelle einzudringen. Es findet sich kein Partikel, welches halb in der Membran steckt oder in einer Senke der Plasmamembran beim endozytotischen Prozess. Erst die erfolgreiche Transfektion ist ein indirekter Beleg für eine Aufnahme der funktionalisierten Kolloide in die Zelle, weil eine alleinige DNA-Zugabe nicht in diesem hohen Maße zu einer Expression des kodierten Fluoreszenzproteins führt [252, 253].

Die Aufnahmen bei hoher Vergrößerung (bis 160000-fach) in Abbildung **80** zeigen einzelne Kolloide auf der Zelloberfläche zwischen den Filopodien. Diese erreichen hier eine Länge von mehreren hundert nm bis einem μm . Einige der Kolloide sind gut auf der Membran zu erkennen. Bei einigen anderen Erhebungen ist es schwer zu entscheiden, um was es sich dabei handelt. Möglicherweise sind es Partikel nach dem Beginn der Endozytose. Gerade von der Membran umschlossen, mögen sie noch als Ausbeulung auf der Oberfläche erkennbar sein. Andererseits kann es sich hierbei auch um den Beginn einer Ausstülpung eines Filopodiums handeln. Da eine lokale EDX-Analyse auf so kleinem Raum kein verwertbares Resultat liefert, kann man nicht mit Gewissheit ein abschließendes Urteil fällen, um was genau es sich bei solchen Strukturen handelt. Fest steht, dass sich Nanopartikel überall auf der Zelle finden lassen, und eine erfolgreiche Transfektion festgestellt werden kann. Die Frage nach dem „Wie“ kann mit diesen Methoden nicht beantwortet werden. Eine Verfolgung der Nanopartikel auf dem Weg in den Zellkern ist sehr

anschaulich von Sokolova et al. 2007 publiziert worden [222]. Hier gelang die Verfolgung der Partikel durch eine Inkorporation von einem roten Fluoreszenzmarker in die Partikel. Durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie konnte der Weg der Partikel vom Medium durch das Zytoplasma bis in den Nukleus dreidimensional nachvollzogen werden.

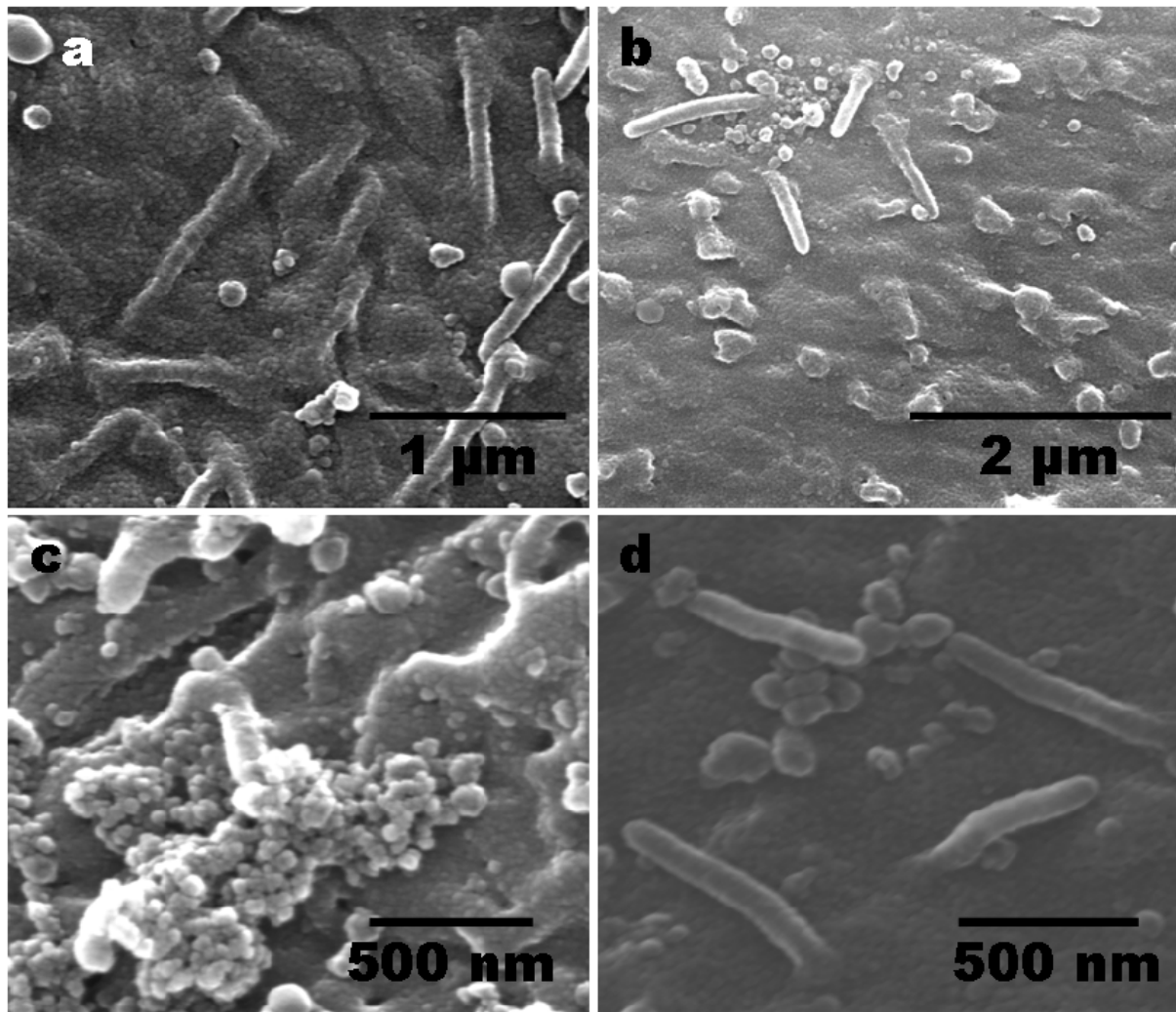


Abbildung 80: REM-Aufnahmen in hoher Vergrößerung von Teilbereichen der Zellmembranen mit darauf befindlichen Kolloiden. Die Zellen wurden auf Titansubstraten ausgesiedelt, die mit PEI/DNA-Kolloiden elektrophoretisch beschichtet wurden.

3.7.5 Analyse der FACS-Daten

Um eine bessere statistische Auswertung der Transfektionseffizienz zu erhalten, wurden die Zellen nach den Experimenten einer FACS-Analyse unterzogen. Als Kontrolle diente ein Stück Titanblech in derselben Größe wie die beschichteten Substrate, dem keine Nanopartikel oder DNA zugesetzt wurde. Es wurden weiterhin Zellen untersucht, die auf mit Calciumphosphat/DNA Nanopartikeln beschichteten Titansubstraten ausgesiedelt wurden. Ebenso wurden Zellen nach ihrer Transfektion auf mit Calciumphosphat/PEI/DNA-Kolloiden beschichteten Substraten untersucht. Als Vergleich wurde das kommerzielle Polyfect im Hinblick auf seine Effizienz untersucht. Dieses wurde auf Zellen angewendet, die ebenfalls an einem Titansubstrat adhärten. Ein repräsentatives Ergebnis der Analyse von einem Kontrollexperiment ist in Abbildung **81** dargelegt. Es wurde die Intensität der grünen Fluoreszenz gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Die X-Achse stellt die gemessene relative Fluoreszenzintensität in logarithmischer Skala dar. Auf der Y-Achse sind die detektierten Ereignisse (Zellen) aufgetragen. Das erkennbare Maximum bei etwa 100 relativer Intensität, stellt die Autofluoreszenz der Zellen dar. Die kleineren Signale bei sehr geringer Intensität sind Zelltrümmer oder andere Artefakte aus der Zelldispersion. Eine Expression des grünen EGFP kann nicht festgestellt werden, da im höheren Fluoreszenzbereich keine Ereignisse auftreten. Zur quantitativen Auswertung wird der Bereich oberhalb der Autofluoreszenz in einer Auswahl der Ereignisse erfasst (Gate). Im Bereich des Gates liegen in der Regel bei den Kontrollexperimenten 1-2 % der Ereignisse, was einen charakteristischen Messfehler darstellt. In der Theorie dürften sich hinter der Autofluoreszenz keine Signale finden lassen.

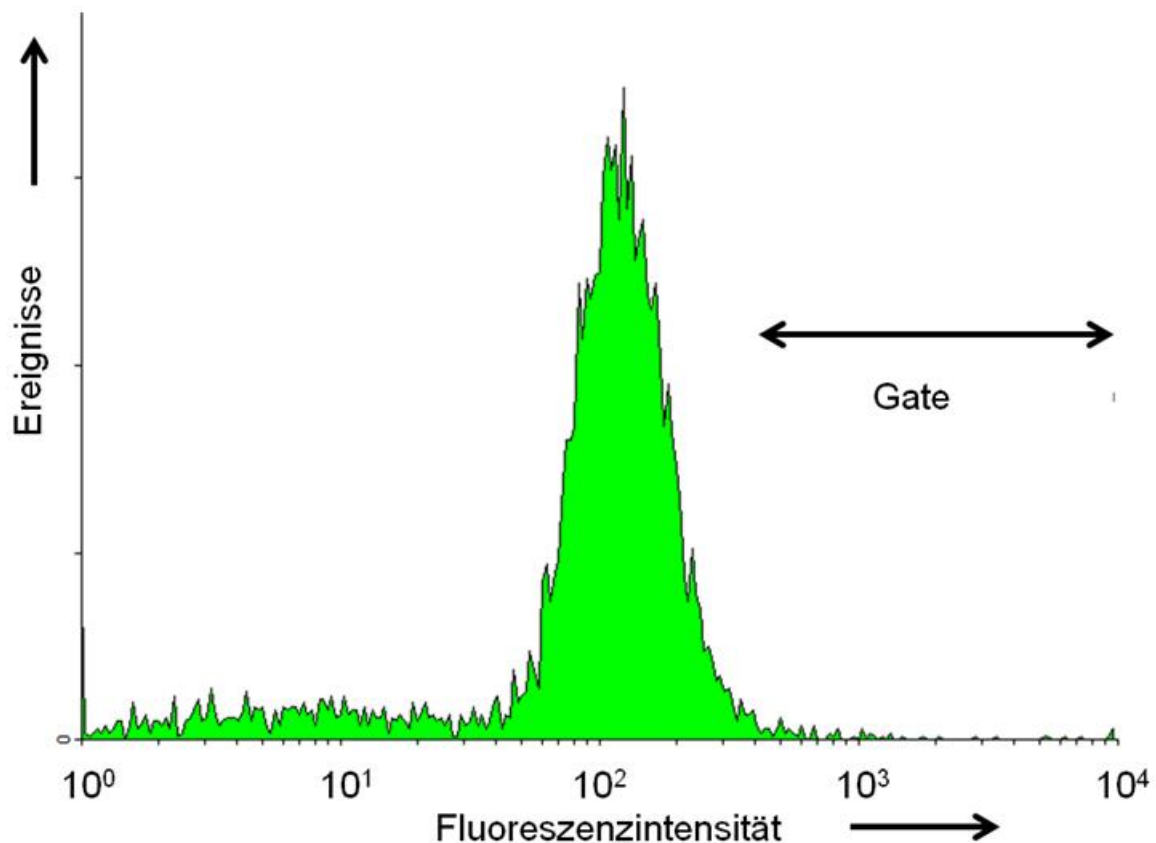


Abbildung 81: Repräsentative FACS-Analyse der Kontrollexperimente von NIH3T3-Zellen auf Titansubstraten. Das Gate M1 wurde an den Fuß des Autofluoreszenzberges gesetzt. Die Effizienz betrug in allen Fällen weniger als 2 %.

Die FACS-Analyse in Abbildung **82** stellt ein Ergebnis für die Beschichtungen dar, die mit DNA-funktionalisierten Kolloiden beschichtet wurden. Im Bereich des Gates finden sich 2,5 % fluoreszierende Zellen wieder. Die Effizienz liegt somit kaum über der Kontrollprobe. Die Ursachen für solch eine schlechte Effizienz liegen in der unzureichenden Beschichtung des Titansubstrats. Nur ein Teil der Zellen hatte somit Kontakt zu DNA-funktionalisierten Partikeln. Da weiterhin nicht alle Zellen, die auch Partikel aufnehmen, erfolgreich transfiziert werden, verringert dies weiterhin die Effizienz dieses Systems.

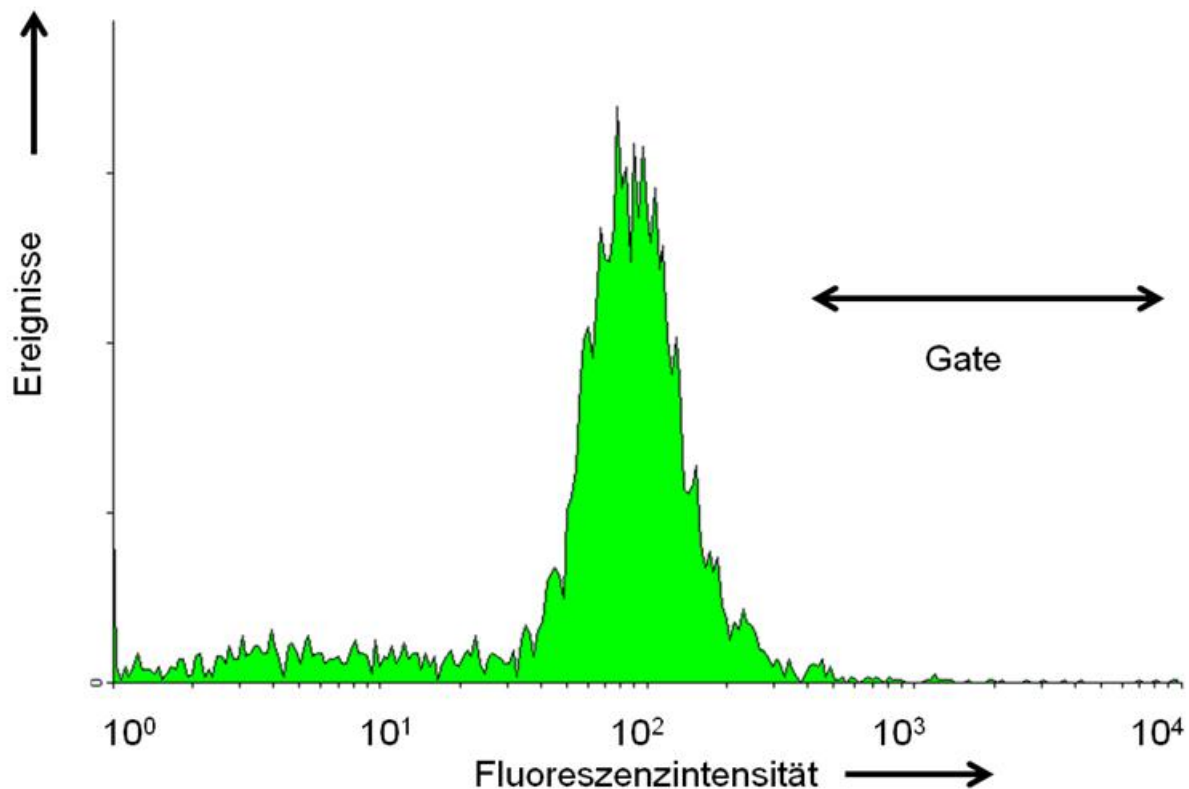


Abbildung 82: Repräsentative FACS-Analyse von NiH3T3-Zellen nach 48-stündiger Inkubationszeit auf einer Schicht von Calciumphosphat/DNA-Nanopartikeln. Die Effizienz der Transfektion betrug 2,5 %. Ein Unterschied zur DNA-freien Kontrolle war kaum erkennbar.

Die Verwendung von Polyfect sollte als eine der „State of the Art“-Methoden gelten, an dessen Transfektionseffizienz sich das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte System messen lassen muss. Die Verwendung von Polyfect wird in vielen Publikation zum Vergleich mit neuen Systemen herangezogen [95, 97, 126, 143]. Die in Abbildung **83** dargestellte FACS-Analyse des Polyfect-Experiments unterscheidet sich schon deutlich von den vorhergehenden Darstellungen. Der Bereich hinter der Autofluoreszenz ist deutlich höher. Die Transfektionseffizienz liegt bei 16,5 %. Dieser Wert deckt sich mit den Ergebnissen, die von Sokolova et al. durch die optischen Auswertungen der Fluoreszenzmikroskopischen Bilder erhalten wurde [126].

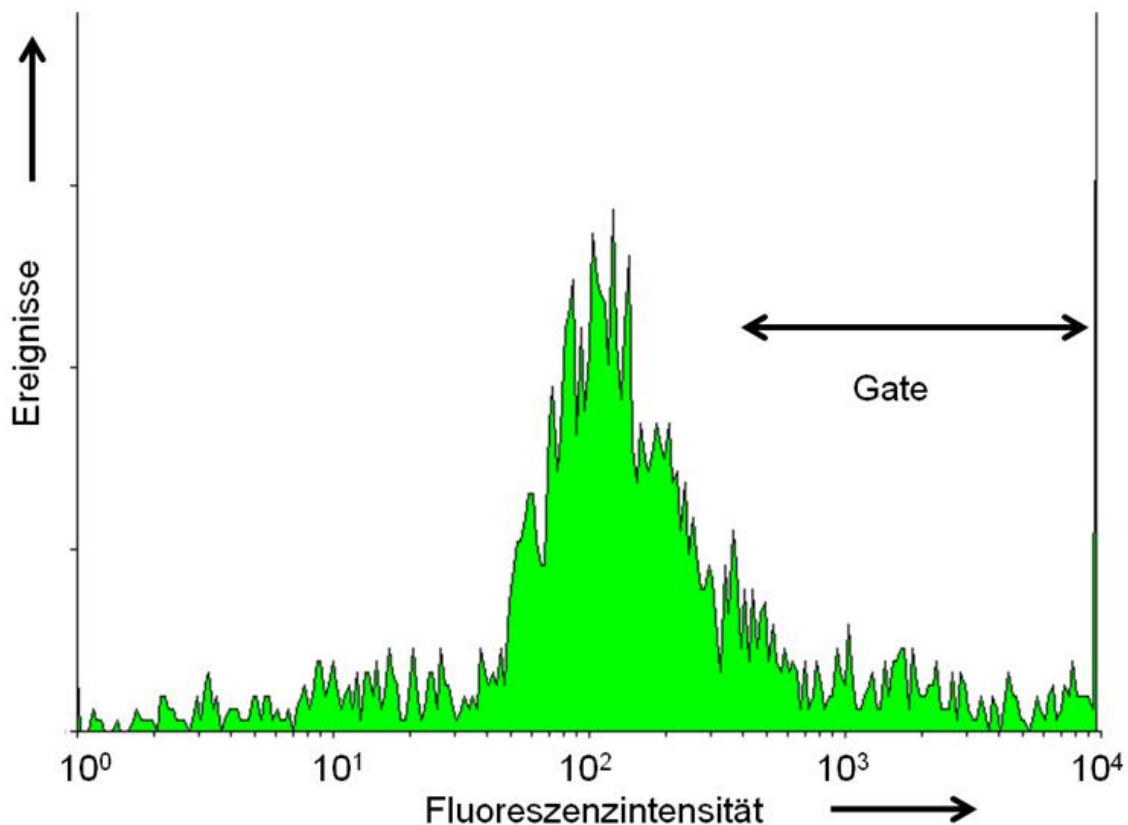


Abbildung 83: Repräsentative FACS-Analyse von NiH3T3-Zellen, die mit Polyfect transfiziert wurden. Das Gate wurde so gewählt, dass der untere Fuß des Autofluoreszenzberges mit erfasst wurde. Die Transfektionseffizienz betrug 16,5 %.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, die in Abschnitt **3.7.5** gezeigt wurden, ließen auf eine hohe Effizienz der Transfektion von den Calciumphosphat/PEI/DNA-Beschichtungen schließen. Die statistische Auswertung im FACS ist in Abbildung **84** dargestellt. Es ist sofort ein zweites Maximum bei höherer Fluoreszenzintensität erkennbar. Dies stellt die Signale der erfolgreich transfizierten Zellen dar. Da der Fuß des Autofluoreszenzsignals nicht gut erkennbar war, wurde als Grenze des Gates ein höherer Wert als bei der Kontrolle festgelegt, um nicht zu viele positive Signale zu erfassen. Die Transfektionseffizienz schwankte dabei zwischen 44,1 % und 80,2 %. Ein Ergebnis, das deutlich über dem industriellen Standard von Polyfect, oder ähnlichen Transfektions-Vektoren wie Lipofect und Magnetofect liegt. Die Streuung der Ergebnisse lässt sich bei näherer Analyse des gewählten Versuchsaufbaus finden. Die dispersen Vektoren in der Zellkultur wandern durch Diffusion im Medium umher und werden dann von einigen Prozent der Zellen aufgenommen und erfolgreich transkribiert. Man kann hierbei davon ausgehen, dass sich der Vektor gleichmäßig im gesamten Medium verteilt. Die

beschichteten Titansubstrate hatten eine Abmessung von $8 \times 8 \text{ mm}^2$, was einer Fläche von $0,64 \text{ cm}^2$ entspricht. Jeder einzelne Well hatte eine runde Grundfläche von $1,88 \text{ cm}^2$. Beim Aussiedeln der Zellen in die Mitte jedes einzelnen Wells war nicht gewährleistet, dass auch alle Zellen auf dem Substrat adhären oder auch bleiben würden.

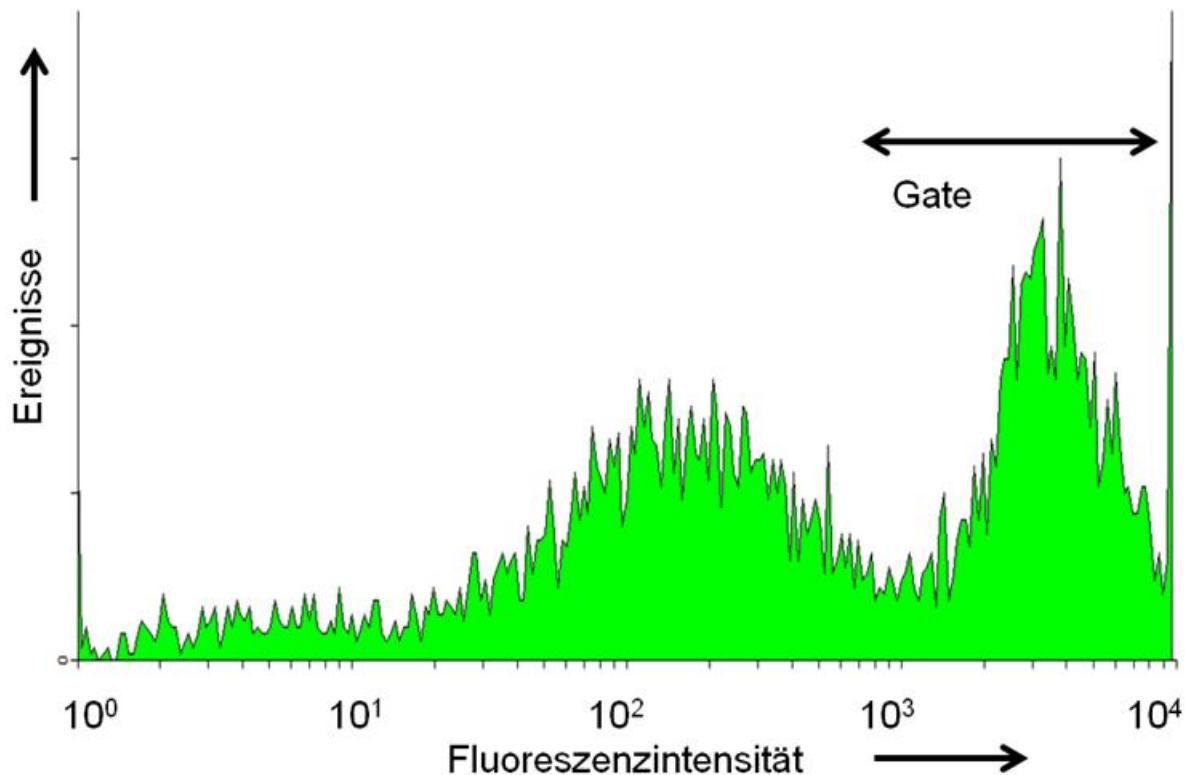


Abbildung 84: Repräsentative FACS-Analyse von NiH3T3-Zellen, nach einer 48-stündigen Inkubationszeit auf einer Calciumphosphat/PEI/DNA-Nanopartikelschicht. Deutlich erkennbar ist das zweite Maximum hinter dem Autofluoreszenz-Berg. Die Transfektionseffizienz lag zwischen 44 und 80 %.

Die Fluoreszenzbilder von mit Zellen besiedelten Bereichen des Substrats weisen eine hohe Zahl an grün fluoreszierenden Zellen auf (Abbildung 74). Die Bereiche neben dem Substrat wurden nicht analysiert. Hier fänden sich sicherlich weitere Zellen, die ohne Kontakt zur transfizierenden Schicht auch keine Nanopartikel aufnehmen konnten. Nur Partikel, die sich aus der Schicht lösten und durch Diffusion zu den Zellen außerhalb der Substratoberfläche gelangten, konnten eine Transfektion auslösen. Die Wahrscheinlichkeit für solch einen Vorgang ist jedoch eher gering. Diese nicht transfizierten Zellen wurden nach der Ablösung und Überführung ins FACS statistisch als nicht leuchtende Zellen mit erfasst und damit als negativ für das Ergebnis gewertet. Für die weitere Arbeit in der Zukunft wäre es von Vorteil, den Aufbau

dahingehend zu modifizieren, einen möglichst großen Bereich der Grundfläche mit dem beschichteten Substrat abzudecken oder zu versuchen, nur die Zellen auf dem Substrat zu trypsinieren und im FACS zu analysieren.

3.7.6 Zusammenfassung der Transfektionsergebnisse

Im Vergleich der drei verschiedenen vorgestellten Techniken hat sich die dritte am besten bewährt. Die DNA-funktionalisierten Kolloide wiesen eine nur geringe Transfektionseffizienz auf, die im unteren Bereich der Literatur für solche Systeme liegt [92, 126, 221, 254]. Sehr schlecht ist das Ergebnis aber im Hinblick auf die erhaltene Beschichtung und Dispersion. Die ungleichen Schichten und schnelle Agglomeration dieses Systems erfordern weitere Forschungsarbeiten im Hinblick auf eine stabile Dispersion in einem organischen Solvent, aus dem sich auch eine elektrophoretische Abscheidung durchführen lässt. Da die weiteren Methoden aber bessere Resultate ermöglichten, ist es fraglich, ob eine Verfolgung dieses Ansatzes aus technischer Sicht Sinn ergibt.

Methode	Transfektionseffizienz /%	
	Bestimmung durch Fluoreszenzmikroskopie	Bestimmung durch FACS
Standard-Calciumphosphat Methode in RPMI 1640 mit FCS und T-HUVEC Zellen [126]	5.2 ± 0.2	-
DNA-funktionalisierte Kolloide (RPMI 1640 mit FCS)	2.7 ± 1.2 [126] mit T-HUVEC Zellen	2,5 % mit NiH3T3 Zellen
CaP/DNA/HAP zweischalige Partikel in RPMI 1640 mit FCS und T-HUVEC Zellen [126]	4.9 ± 1.7	-
CaP/DNA/CaP/DNA dreischalige Kolloide in RPMI 1640 mit FCS [126]	6.1 ± 2.6	-
Kontrolle (Zellen auf Titan ohne DNA Zugabe) in RPMI 1640 mit FCS	0 mit T-HUVEC Zellen	2 ± 0,3 mit NiH3T3 Zellen
Polyfect (nach Herstellerangaben) in RPMI 1640 mit FCS	10.9 ± 3.0 [126] mit T-HUVEC Zellen	18,3 ± 6,2 mit NiH3T3 Zellen
CaP/PEI Kolloide + DNA Zugabe in RPMI 1640 mit FCS	ca. 70 mit NiH3T3 Zellen	25,25 ± 4,6 mit NiH3T3 Zellen
CaP/PEI/DNA zweischalige Kolloide in RPMI 1640 mit FCS	ca. 90 mit NiH3T3 Zellen	62,3 ± 23,5 mit NiH3T3 Zellen

Tabelle 6: Tabellarische Übersicht der erzielten Transfektionsergebnisse im Vergleich zu den Literaturdaten.

Die Funktionalisierung mit PEI ist eine einfache Möglichkeit, um eine größere Menge an weiter umsetzbaren Nanopartikeln lagerfähig herzustellen. Die getrockneten Partikel lassen sich wieder in Wasser (dort aber nicht als stabile Dispersion) oder in organischen Solventien redispergieren, und die damit beschichteten Substrate bieten die Andockmöglichkeit für negativ geladene Substanzklassen wie DNA. Auch hier fällt aber negativ auf, dass sich diese Schicht mit leichtem mechanischen Druck von der Substratoberfläche lösen lässt.

Dennoch lässt sich abschließend ein sehr positives Bild der erzielten Resultate der zweischaligen Calciumphosphat/PEI/DNA-Nanopartikel zeichnen. Die Effizienz des hier entwickelten Systems zur Transfektion ist bemerkenswert hoch und einfach in seiner Darstellung. Ein auf diese Weise beschichtetes Implantat bringt hervorragende Eigenschaften zur gentherapeutischen Anwendung mit. Die Beschichtung ist, aufgrund des nur in sehr geringem Maße verwendeten PEI, nicht toxisch, sie hat eine sehr gute Transfektionseffizienz und lässt sich auf alle polarisierbaren Materialien, die sogar porös sein können, auf- und einbringen. In einem optimierten Versuchsaufbau ließen sich sicherlich Effizienzen nahe 100 % erzielen.

4 Materialien und Methoden

In diesem Teil der Arbeit sollen kurz die verwendeten Untersuchungsmethoden und ihre theoretischen Grundlagen erläutert werden. Alle verwendeten Methoden konnten immer nur einen Teil zur Charakterisierung der Präparate beitragen. Des Weiteren werden die Syntheseverfahren der Nanopartikel, ihre Trocknungsmethoden und die experimentellen Parameter der Zellexperimente dargelegt.

4.1 Synthese und Funktionalisierung der Calciumphosphat-Nanopartikel

4.1.1 Calciumphosphat-Nanopartikel

Die Kolloide wurden in einem kontinuierlichen Prozess synthetisiert und über eine Saugflasche mit 100 nm Membranfilter abgesaugt, dann zunächst mit Reinstwasser gewaschen und je nach verwendeter Trocknungsmethode dann noch mal mit 2-Propanol gewaschen, anschließend an Luft bei 37 °C getrocknet oder lyophilisiert. Die Pumpgeschwindigkeit betrug 30 mL min⁻¹. Die Calciumlactat-Lösung (5,54 g; 18 mmol L⁻¹, Fluka) und die Di-Ammoniumphosphat-Lösung (1,43 g; 10,8 mmol L⁻¹, Merck) wurden mit Ammoniak (30 %, p.a., Merck) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Das Reaktorvolumen betrug bei der zweistufigen Synthese 250 mL, im Rohrreaktor betrug es 57,05 mL, die Fällungen erfolgten jeweils bei Raumtemperatur.

4.1.2 Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PAH

Die Fällung erfolgte wie in Abbildung 12 gezeigt. Die Pumpgeschwindigkeit der Calcium- und Phosphat-Lösung betrug 5 mL min⁻¹. Die Konzentration an PAH im Rohr-Reaktor betrug 1,5 g L⁻¹ bei einer Pumpgeschwindigkeit von 10 mL min⁻¹. Die Kolloide wurden über einen 100 nm-Membranfilter filtriert und mit Reinstwasser gewaschen. Danach erfolgte der weitere Waschschriff mit 2-Propanol. Eine Trocknung erfolgte entweder bei 37 °C im Trockenschrank oder durch Lyophilisation. Nach Trocknung erfolgte die Redisperstion von 0,3 g

Kolloiden in 50 mL 2-Propanol. Die Dispersion wurde hierzu 30 min im Ultraschallbad behandelt.

4.1.3 Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PSS

Die Fällung erfolgte wie in Abbildung 12 gezeigt. Die Pumpgeschwindigkeit der Calcium- und Phosphat-Lösung betrug 5 mL min^{-1} . Die Konzentration an PSS im Reaktor betrug 1 g L^{-1} bei einer Pumpgeschwindigkeit von 10 mL min^{-1} . Die Kolloide wurden über einen 100 nm-Membranfilter filtriert und mit Reinstwasser gewaschen. Danach erfolgte der weitere Waschschrift mit 2-Propanol. Eine Trocknung erfolgte entweder bei 37°C im Trockenschrank oder durch Lyophilisation. Nach Trocknung erfolgte die Redisperion von 0,3 g Kolloiden in 50 mL 2-Propanol. Die Dispersion wurde hierzu 30 min im Ultraschallbad behandelt.

4.1.4 Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PVP

Die Fällung erfolgte wie in Abbildung 12 gezeigt. Die Pumpgeschwindigkeit der Calcium- und Phosphat-Lösung betrug 30 mL min^{-1} . Die Konzentration an PVP (Fluka, PVP K30, p.A., MW 40k) im Reaktor betrug 5 g L^{-1} bei einer Pumpgeschwindigkeit von 30 mL min^{-1} . Die Filtration erfolgte über einen 100 nm-Membranfilter. Die anschließende Waschung der Partikel erfolgte mit Reinstwasser. Danach erfolgte der weitere Waschschrift mit 2-Propanol. Eine Trocknung erfolgte entweder bei 37°C im Trockenschrank oder durch Lyophilisation. Nach Trocknung erfolgte die Redisperion von 0,3 g Kolloiden in 50 mL 2-Propanol. Die Dispersion wurde hierzu 30 min im Ultraschallbad behandelt.

4.1.5 Calciumphosphat-Nanopartikel, funktionalisiert mit PEI

Die Fällung erfolgte wie in Abbildung 12 gezeigt. Die Pumpgeschwindigkeit der Calcium- und Phosphat-Lösung betrug 2 mL min^{-1} . Die Konzentration an PEI (Aldrich, MW 10 kDa und 750 kDa, beides branched) im Reaktor betrug 2 g L^{-1} bei einer Pumpgeschwindigkeit von 4 mL min^{-1} . Die Filtration erfolgte über

einen 100 nm-Membranfilter. Die anschließende Waschung der Partikel erfolgte mit Reinstwasser. Danach erfolgte in der Regel der weitere Waschschrift mit 2-Propanol. Eine Trocknung erfolgte entweder bei 37 °C im Trockenschrank oder durch Lyophilisation. Nach Trocknung erfolgte die Redispersion von 0,3 g Kolloiden in 50 mL 2-Propanol. Die Dispersion wurde hierzu 30 min im Ultraschallbad behandelt.

4.1.6 Synthese der zweischaligen Calciumphosphat/PEI/DNA-Nanopartikel

Die Fällung erfolgte wie in Abbildung 12 gezeigt. Die Pumpgeschwindigkeit der Calcium- und Phosphat-Lösung betrug 2 mL min^{-1} . Die Konzentration an PEI (Aldrich, MW 10 kDa und 750 kDa, beides branched) im Reaktor betrug 2 g L^{-1} bei einer Pumpengeschwindigkeit von 4 mL min^{-1} . Die Filtration erfolgte über einen 100 nm-Membranfilter. Die anschließende Waschung der Partikel erfolgte mit Reinstwasser. Danach erfolgte in der Regel der weitere Waschschrift mit 2-Propanol. Eine Trocknung erfolgte entweder bei 37 °C im Trockenschrank oder durch Lyophilisation. Nach Trocknung erfolgte die Redispersion von 150 mg Kolloiden in 1 mL Reinstwasser. Die Dispersion wurde hierzu 30 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 150 μL DNA Lösung ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). Die Plasmid-DNA (pcDNA3-EGFP) kodierte ein grün fluoreszierendes Protein; diese DNA wurde zuvor aus E. Coli Bakterien gewonnen und mittels Nucleobond[®] aufgereinigt (Endotoxinfreie Plasmid-DNA, Macherey-Nagel, Düren). Zum Austausch des Dispersionsmediums wurde die Lösung in einem Eppendorfgefäß (1,5 mL) fünfmal zentrifugiert und mit Ethanol wieder aufgefüllt. Nach jedem Austausch erfolgte eine Redispergierung im Ultraschallbad für 10 min.

4.2 Methoden der Zellkultivierung und Transfektion

Die Arbeiten zu den Zellexperimenten wurden am Institut für Biochemie an der Universität Bochum im Arbeitskreis bei Prof. Dr. R. Heumann von Frau A. Kovtun durchgeführt. Es wurden nur sterile Lösungen und Materialien in einer belüfteten Werkbank verwendet.

4.2.1 Kultivierung der sekundären Zelllinien

NiH3T3-Zellen wurden in einer mit Bicarbonat gepufferten Lösung von RPMI 1640 mit 10 % FCS, 2mM Glutamin, 100 U mL⁻¹ Penicillin als auch Streptomycin bei 37 °C kultiviert. Die Atmosphäre war mit Wasser gesättigt und enthielt 5 % CO₂. Zellen mit einer Konfluenz von 70-100 % wurden dann zwei mal mit PBS gewaschen mit einer 0,25 %-igen Trypsin-Lösung versetzt, um die adhärierenden Zellen zu lösen. Diese Lösung wurde dann zentrifugiert (Biofuge, 900 rpm / 160 g, 5 min., Raumtemperatur) und der Trypsin-haltige Überstand entfernt. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine 75 mL-Gefäß überführt. Die Zelldichte in der Suspension wurde mit einer Neubauer'schen Zählkammer bestimmt.

4.2.2 Kryokonservierung der Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die Zellsuspensionen mit PBS gewaschen, trypsiniert und anschließend zentrifugiert. Sie wurden dann in 1 mL FCS mit 7,5 % DMSO gegeben und in ein Kryoröhrchen gefüllt. Dieses wurde dann langsam im Verlauf von 24 h auf -80 °C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell auf 37 °C erwärmt. Zur Vermeidung eines osmotischen Schocks wurde innerhalb der ersten 5 min 5 mL FCS zugegeben. Die aufgetauten Zellen wurden dann zentrifugiert (Biofuge, 900 rpm / 160 g, 5 min, Raumtemperatur) und in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Um die Reste an DMSO zu entfernen, wurde das Medium nach 24 h erneut gewechselt.

4.2.3 Transfektion von Oberflächen

Zur Beschichtung wurden Silicium-Wafer (10x10 mm², Silchem, p-dotiert) und Titanbleche (8x8 mm², Goodfellow, 99,99 %) verwendet. Beide wurden mit Ethanol gewaschen und mit Zellstoff abgerieben. Zur Beschichtung wurde eine Dispersion von zweischaligen Calciumphosphat/PEI/DNA-Kolloiden verwendet, deren Herstellung unter 4.1.6 zu finden ist.

Die benötigten Zellen wurden in RPMI 1640 Medium kultiviert, dem zuvor 10 % FCS bei 37 °C zugefügt wurde. Einen Tag vor den Transfektionsversuchen wurden die Zellen trypsinisiert und in Zellkultur-Platten ausgesiedelt. Die Anzahl an Zellen betrug $5 \cdot 10^4$ auf einer 24-Well Platte, was in einer Anzahl von $2,5 \cdot 10^3$ Zellen pro Well resultierte, da nicht jeder Well genutzt wurde. Die Transfektionseffizienz wurde nach 24 h über ein Fluoreszenzmikroskop und Durchflußzytometrie bestimmt.

4.2.4 Transfektion mit Polyfect zum Vergleich

Polyfect (Quiagen, Hilden) ist ein Dendrimer-basiertes, kommerziell erhältliches Produkt zur Transfektion. Die Benutzung erfolgte gemäß den Herstellervorgaben. Hierzu wurden 2 µg der gewünschten DNA in 100 µL Medium ohne FCS gelöst und 22 µL Polyfect zugesetzt. Nach einer kurzen Reaktionszeit von 5 min wurde die Mischung mit 800 µL Zellkulturmedium versetzt. Aus der Zellkultur wurde das Medium entfernt und durch 400 µL frisches Medium ersetzt. Dann wurden 200 µL der Transfektionssuspension hinzugesetzt und für 7 Stunden stehen gelassen. Pro Transfektionsversuch wurden somit 2 µg DNA verbraucht.

4.3 Verwendete Methoden der Charakterisierung

In diesem Abschnitt soll eine kurze Einführung und Übersicht über die physikalischen Methoden gegeben werden, mit deren Hilfe die Ergebnisse dieser Arbeit produziert wurden.

4.3.1. Dynamische-Lichtstreuung zur Bestimmung der Größenverteilung

Die Dynamische Lichtstreuung als Methode zur Bestimmung des Hydrodynamischen Radius von Partikeln oder Molekülen in Dispersion wird auch als Photonenkorrelationsspektroskopie bezeichnet. Das eingestrahlte Licht, hauptsächlich wird monochromatisches Laserlicht verwendet, streut an verschiedenen Streuzentren in der Probe. Die gestreuten Lichtstrahlen interferieren miteinander und führen zu einer Fluktuation in der Streuintensität. Anhand einer Verfolgung der Interferenzen in Abhängigkeit von der Zeit lassen sich so verschiedene Daten gewinnen. Diese werden mit Hilfe einer Autokorrelationsfunktion in physikalische Daten umgewandelt. Die Lichtstreuung durch Kolloide in Dispersion wurde erstmals 1871 von Tyndall in der Literatur beschrieben. Sind die streuenden Partikel kleiner als die Wellenlänge des eingestrahnten Lichts, so wird von der Rayleigh-Streuung gesprochen. Die Intensität des Streulichts hängt in folgender Beziehung von der Wellenlänge ab.

$$I_s \propto 1 \times \lambda^{-4} \quad \text{Gleichung 4}$$

I_s : Intensität der Streustrahlung

λ : Wellenlänge

Kurzwelliges Licht wird somit stärker gestreut als langwelliges.

Auf diese Weise kommt auch die blaue Farbe des Himmels zustande. Die blaue Komponente des polychromatischen Sonnenlichts wird stärker gestreut als die Rotanteile.

Die Auswertungen von Lichtstreuemessungen liefern Auskünfte über:

- Teilchengestalt und Teilchengröße
- Dispersität des kolloidalen Systems
- Molmasse der Teilchen
- Wechselwirkung zwischen den kolloidalen Partikeln

Die dynamische Lichtstreuung knüpft an das Doppler-Prinzip an. Eine wellenaussendende Quelle bewegt sich mit einer bestimmten Geschwindigkeit auf den Beobachter zu. Dabei erfährt diese Welle eine Frequenzverschiebung. Dies ist hierbei das Kolloid, welches eine Brown'sche Molekularbewegung ausführt und das eingestrahlte Licht streut. Unter Annahme von kugelförmigen Teilchen lässt sich mit Hilfe der Stokes-Einstein-Beziehung der hydrodynamische Radius der Teilchen ermitteln.

$$D_t = k_b T / 6\pi\eta R_h \quad \text{Gleichung 5}$$

D_t : translatorischer Diffusionskoeffizient;

k_b : Boltzmann Konstante;

T : Temperatur;

η : Viskosität des Dispersionsmittels;

R_h : Hydrodynamischer Radius.

Die Messungen zur Berechnung der Teilchengröße wurden an einem Malvern Zetasizer NanoZS durchgeführt. Wässrige Proben konnten in der gefalteten Polystyrol-Kapillarzelle vermessen werden, Proben in organischen Lösungsmitteln wurden in einer Quarzglas-Küvette vermessen. Der schematische Aufbau des Strahlengangs im Zetasizer ist in Abbildung 85 dargestellt.

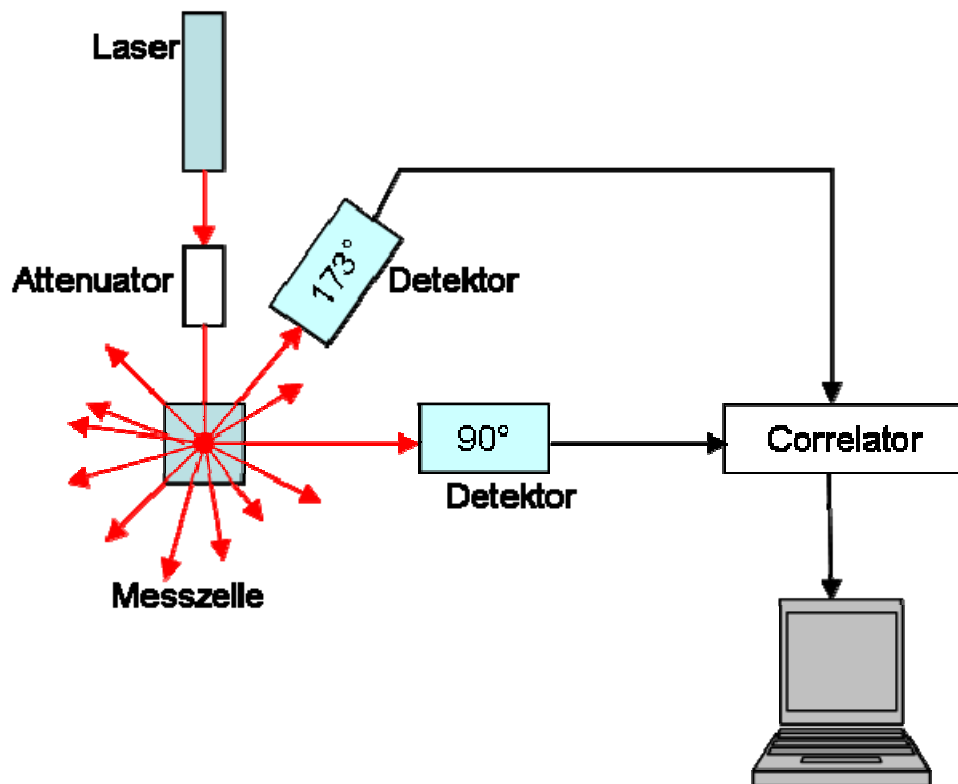


Abbildung 85: Schematische Darstellung des Strahlengangs im Malvern Zetasizer NanoZS.

Der besondere Vorteil der neuen Generation von dynamischen Lichtstreuengeräten ist die Detektion im 173° Winkel gegenüber der älteren 90° Methode. Durch eine Fokuslinse lässt sich der Laserfokus innerhalb der Meßzelle verschieben (Abbildung 86). Bei sehr dünnen Proben liegt der Fokus in der Mitte des Mediums, bei dicken Dispersionen lässt er sich zum Küvettenrand hin variieren. So werden die gestreuten Lichtwellen nicht schon von der Probe selbst verschluckt und können detektiert werden. Im herkömmlichen 90° Prinzip wäre dies nicht möglich, da sich der Detektor ebenfalls mit bewegen müsste.

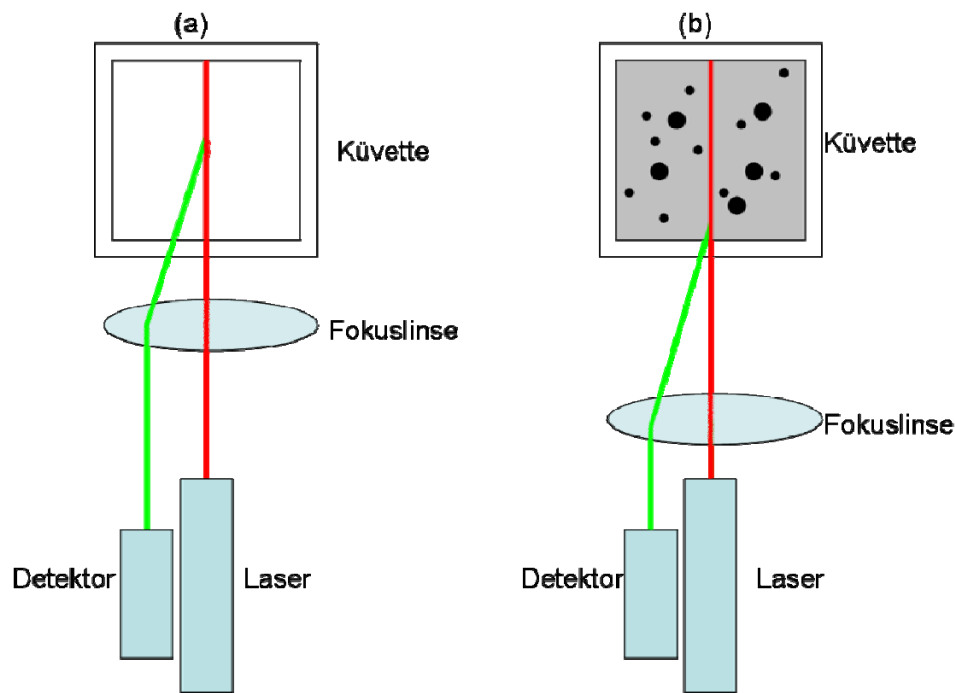


Abbildung 86: Schematische Darstellung der Vorteile einer Messung im 173° Winkel. Hierbei können aufgrund des variablen Laserfokus sowohl niedrig als auch hoch konzentrierte Dispersionen vermessen werden.

4.3.2. Dynamische-Lichtstreuung zur Bestimmung des Zetapotentials

In allen wässrigen Systemen wie Dispersionen und Suspensionen spielt das Zetapotential an den Phasengrenzen fest-flüssig eine wichtige Rolle. Es kann als Maß für die anziehenden bzw. abstoßenden Kräfte zwischen geladenen Teilchen angesehen werden. Das Zetapotential ist keine direkt ermittelbare Größe, sondern muss über Hilfsgrößen bestimmt werden. Das Prinzip ist, dass die Gegenionen in der Scherschicht durch Flüssigkeitsströmung vom geladenen Partikel weggezogen werden. Ein Strömungspotential wird dadurch messbar. Das Vorzeichen des Potentialwertes gibt die vorliegende Ladungsart wieder. Das Zetapotential ist damit ein ungefähres Maß für Stärke und Vorzeichen der Ladung eines Kolloids [147, 255].

Zur Berechnung des Zetapotentials existieren zwei Näherungen: die nach Hückel und nach Smoluchowski. Die Näherung nach Hückel gilt für Teilchen kleiner als 10 nm. Aus diesem Grund wurde für die Berechnungen des Zetapotentials das Modell von Smoluchowski angewendet.

$$B_e = \left(\frac{\varepsilon \cdot \zeta \cdot f_b}{\eta} \right) \cdot \left(\frac{\omega \cdot r^2 \cdot \rho}{\eta} \right)$$

Gleichung 6

B_e : Elektrophoretische Beweglichkeit

ε : Dielektrizitätskonstante

ζ : Zetapotential

η : Viskosität des Dispersionsmittels

ω : Frequenz des elektrischen Feldes

r : Teilchenradius

ρ : Dichte der Dispersion

f_b : Korrekturfaktor

Die Messungen zur Berechnung des Zetapotentials wurden ebenfalls an dem zuvor beschriebenen Malvern Zetaziser NanoZS durchgeführt.

4.3.3 REM (Raster-Elektronenmikroskopie)

Das laterale Auflösungsvermögen eines Lichtmikroskops ist aufgrund der Wellenlänge nach Abbé auf $\frac{1}{2} \lambda$ beschränkt. Für sichtbares Licht bedeutet dies ein Maximum von 200 nm Auflösungsvermögen. Bei der Raster-Elektronenmikroskopie werden Elektronen verwendet, welchen man aufgrund der de Broglie-Beziehung ebenfalls eine Wellenlänge zuordnen kann.

$$\lambda = \frac{h}{mv}$$

Gleichung 7

Für Elektronen mit der Geschwindigkeit v und der Masse m ist die Wellenlänge mit dem Plank'schen Wirkungsquantum ($h = 6,6262 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$) berechenbar. Werden die Elektronen mit einem bestimmten Potential U beschleunigt, so ergibt sich für die Elektronen eine Energie von

$$U \cdot e = \frac{m \cdot v^2}{2}$$

Gleichung 8

mit e als der elektrischen Elementarladung ($e = 1,6022 \cdot 10^{-19} \text{ C}$). Hieraus lässt sich die Abhängigkeit der Wellenlänge von der Beschleunigungsspannung wie folgt berechnen:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2mUe}} \text{ oder direkt in } \text{\AA}: \lambda = \sqrt{\frac{150}{U}}. \quad \text{Gleichung 9}$$

Wenn v sich der Lichtgeschwindigkeit annähert und man die Masse m durch die Ruhemasse des Elektrons ersetzt, so kann mit Hilfe des relativistischen Korrekturfaktors $(1 + Ue/2m_0c^2)^{-1/2}$ die Wellenlänge berechnet werden.

U in kV	λ in \AA	V in 10^8 m/s
40	0,0601	1,122
60	0,0487	1,338
80	0,0487	1,506
100	0,0370	1,644
200	0,0251	2,079
500	0,0142	2,587

Tabelle 7: Abhängigkeit der Wellenlänge des Elektrons von der Beschleunigungsspannung.

Es ist ersichtlich, dass mit zunehmender Spannung die Wellenlänge der Elektronen kleiner, und damit das laterale Auflösungsvermögen des Mikroskops größer wird. Je höher die Spannung, desto mehr geht aber auch die Tiefenschärfe verloren. Die meisten Raster-Elektronenmikroskope arbeiten bei Spannungen zwischen 1-30 kV. Zur Erzeugung der Elektronen werden diese thermisch emittiert, dann im Hochvakuum gebündelt und durch eine zwischen Kathode und Anode anliegende Hochspannung beschleunigt. Mit Hilfe elektromagnetischer Linsen, die aus gebogenen Metallplatten bestehen, wird der Elektronenstrahl mit optimal verkleinertem Durchmesser auf der Probe fokussiert. Ein Ablenkgenerator sorgt mit Hilfe von Ablenkspulen für eine zeilenweise Abtastung der Oberfläche mit dem Strahl (Abbildung 87). Durch Wechselwirkungsprozesse der Primärelektronen mit den Atomen der Probe entstehen diverse Sekundärsignale, insbesondere Sekundär- und Rückstreuelektronen, die von entsprechenden Detektoren in elektrische Signale umgewandelt werden. Diese Signale werden über einen LCD-Monitor als Bild ausgegeben (Abbildung 87).

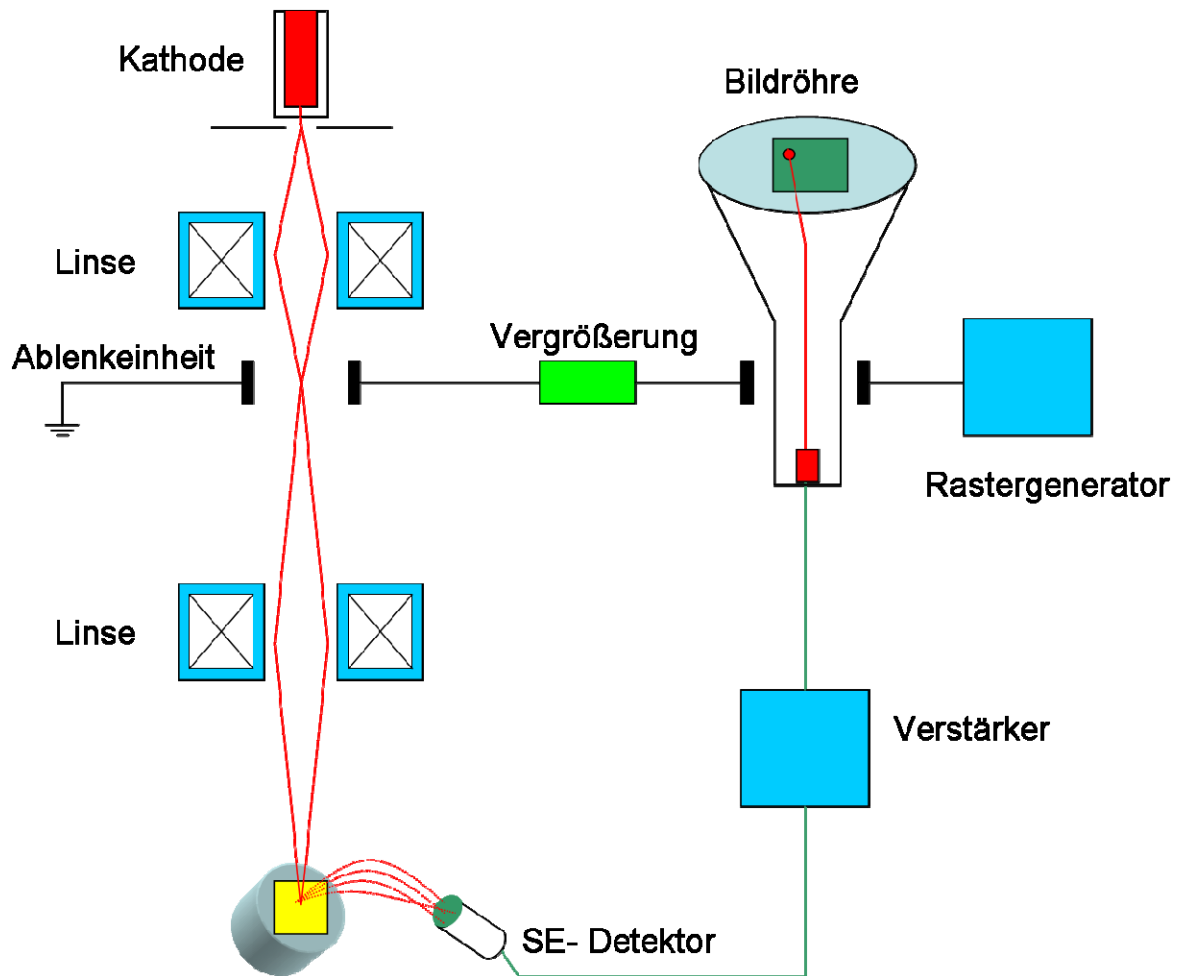


Abbildung 87: Schematische Darstellung des Aufbaus eines REM.

In Abhängigkeit von der Beschleunigungsspannung können Objekte bis zu einer Größe von wenigen Nanometern abgebildet werden. Im Gegensatz zur Transmissionselektronenmikroskopie besitzen die so abgerasterten Bilder eine hohe Tiefenschärfe. Um eine Aufladung der Probe zu vermeiden, wird diese vorher mit Gold oder Kohlenstoff besputtert. Bei noch feuchten Proben ist es möglich, diese in einem ESEM (*enviromental scanning electron microscope*) unter einer Wasserdampf-Atmosphäre von bis zu 2000 Pa abzubilden. Ein Sputtern ist dann nicht nötig, und es lassen sich organische Proben untersuchen, ohne diese vorher durch hohes Vakuum zu beschädigen.

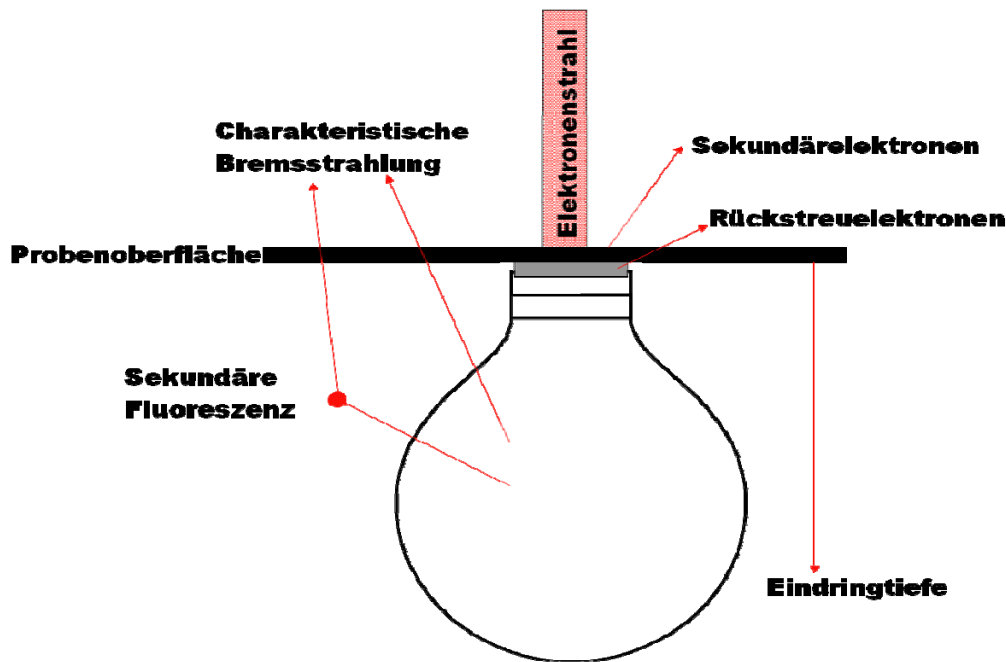


Abbildung 88: Schematische Darstellung der Ionisationsbirne beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf eine Probe im REM. Die Eindringtiefe kann mehrere μm betragen.

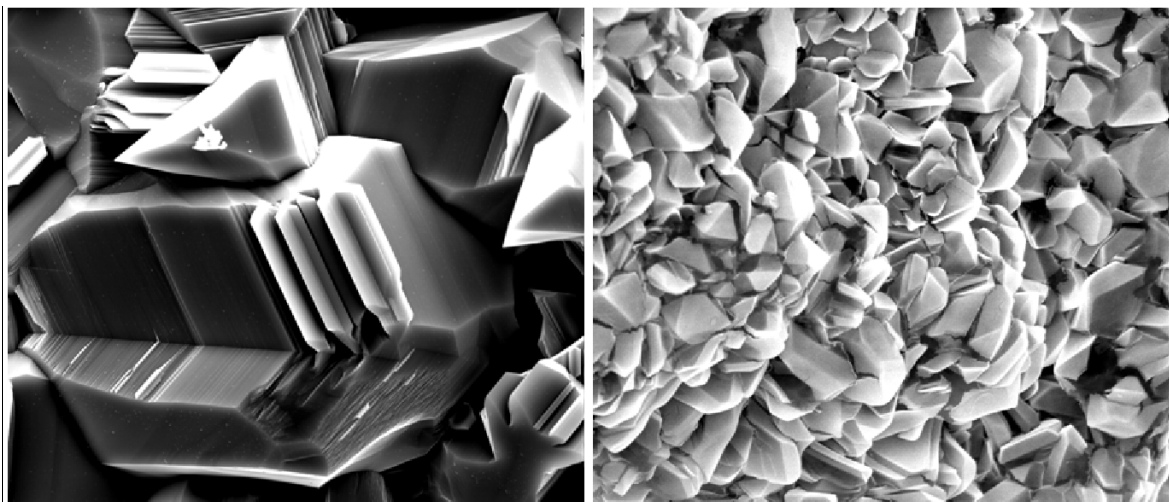


Abbildung 89: REM-Aufnahme eines TiO_2 -Kristalls (links) und von Brushit (rechts).

Die Abbildung 89 zeigt die Möglichkeiten eines REMs, um Kristalline Strukturen mit hoher Tiefenschärfe abzubilden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Bilder wurden mit einem FEI Quanta FEG 400 angefertigt. Das laterale Auflösungsvermögen liegt dabei zwischen 3,0 nm (1 kV) und 1,2 nm (30 kV).

Die Proben wurden mit einer Gold/Palladium-Legierung bedampft. Die erhaltene Schicht ist hierbei nur wenige nm dick und ermöglicht bessere Abbildungen als eine reine Goldschicht, die bis zu 20 nm dick sein kann.

4.3.4 TEM (Transmissions-Elektronenmikroskop)

Im TEM oder HRTEM (*high resolution transmission electron microscop*) werden die Elektronen zur Bildgebung genutzt, die nicht gestreut wurden, sondern durch die Probe hindurch getreten sind. Dabei interferieren die Elektronenwellen mit der Probe und weisen eine Phasenverschiebung auf. Mit dieser Phasenverschiebung lässt sich das Bild rekonstruieren. Der Strahlengang im Mikroskop ist ähnlich dem im REM. Aufgrund von wesentlich höheren Beschleunigungsspannungen lassen sich sehr kleine Objekte abbilden. Bei kristallinen Proben können bei entsprechender Auflösung die Netzebenenscharen des Materials sichtbar gemacht werden. So lassen sich Rückschlüsse auf die Materialphase der Probe ziehen. Die Probe muss hierzu aber sehr dünn sein, um genügend Elektronen durchzulassen. Bei dickeren Proben, wie z.B. Gewebe, muss dieses vorher in Harz eingebettet und dann in dünne Scheiben geschnitten werden. Diese Dünnschnitte können dann untersucht werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Aufnahmen wurden an einem JEOL 3000FEG HRTEM in Madrid angefertigt. Ebenso stand dort ein Oxford LINK EDS zur Elementbestimmung zur Verfügung. Die Proben wurden dazu im Ultraschallbad dispergiert und auf einem Kohlenstoff-beschichtetem Kupfernetz aufgetragen.

4.3.5 EDX (Energiedispersive Röntgenspektroskopie)

Mit Hilfe der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie lässt sich die elementare Zusammensetzung einer Probe durch emittierte Röntgenstrahlen bestimmen. Hierzu muss das Atom zunächst angeregt werden. Im REM geschieht dies durch den Elektronenstrahl. Bei der Verwendung von Röntgenstrahlen zur Anregung spricht man von Röntgen-Fluoreszenzanalyse (EDXRF). Durch die Anregung wird ein Elektron aus einer inneren Schale des Atoms herausgeschlagen. Sofort wird diese Lücke durch ein Elektron aus einer energetisch höheren Schale aufgefüllt. Dieses Elektron emittiert dabei ein charakteristisches Röntgen-Photon. Die Detektion dieses Photons lässt aufgrund seiner bestimmten Energie Rückschlüsse auf das Element zu.

Aufgrund der häufigen Verwendung des Verfahrens im Elektronenmikroskop wird anstelle der richtigeren Bezeichnung REM-EDX lediglich die Kurzform EDX genutzt. Eine schematische Darstellung des Aufbaus im REM findet sich in Abbildung 90.

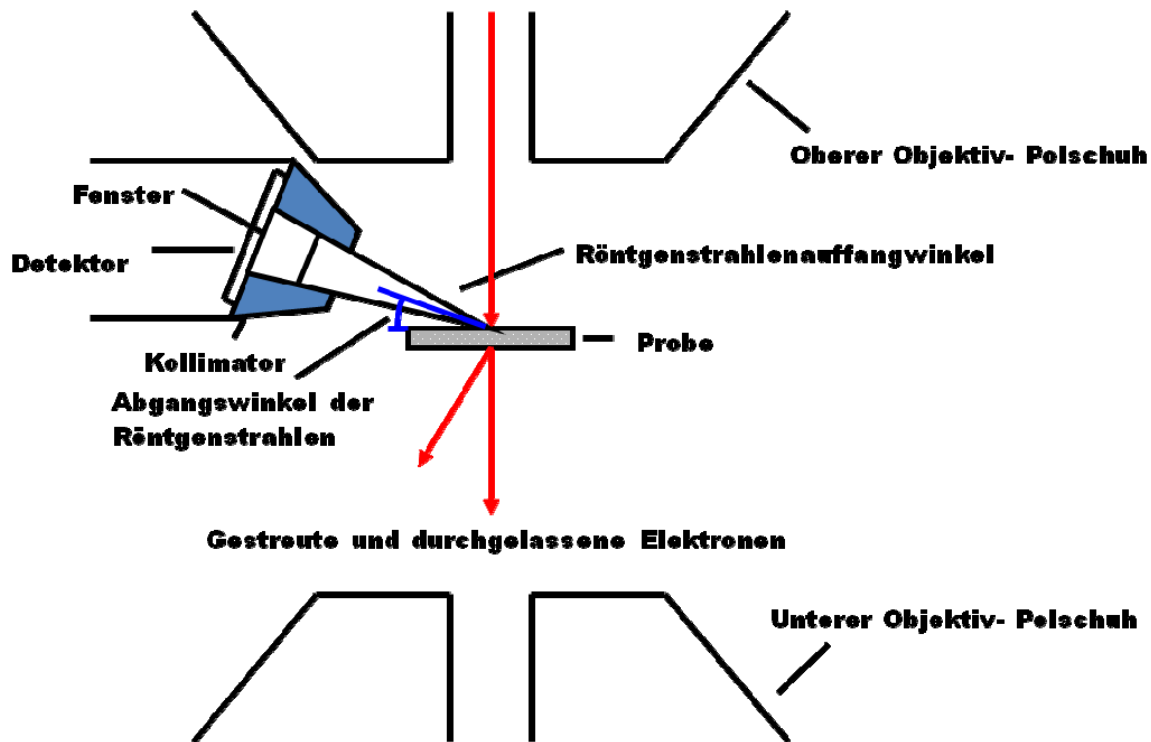


Abbildung 90: Schematische Darstellung der Detektion der Röntgenadsorption im REM.

Die Möglichkeit der Elementbestimmung durch EDX findet sich ebenfalls im TEM. Der apparative Aufbau ist dort nur leicht gegenüber dem REM verändert.

4.3.6 Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD)

Die Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD) ist eine Methode zur Strukturanalyse von Kristallen. Dabei wird die Probe mit monochromatischem Röntgenlicht bestrahlt und die Streustrahlung detektiert. Ein wichtiges Anwendungsgebiet ist hierbei die Identifizierung kristalliner Anteile in Pulverproben.

Die Röntgenbeugungsanalyse benutzt die Eigenschaft von Kristallgittern monochromatisches Röntgenlicht zu beugen. Dabei treten Interferenzen an den aufeinander folgenden Netzebenen im Kristallgitter auf. Die gestreuten Wellen werden durch die Bragg'sche Gleichung beschrieben:

$$n \lambda = 2 d_{hkl} \sin \vartheta \quad (n = 1, 2, 3, \dots)$$

Gleichung 10

wobei λ die Wellenlänge, d_{hkl} der Netzebenenabstand und ϑ der halbe Beugungswinkel sind. Mit dieser Beziehung lassen sich die Strukturen von Kristallgittern lösen.

Bei Diffraktogrammen von nicht phasenreinen Pulvern können mehrere Beugungsmuster verschiedener kristalliner Anteile überlagert sein.

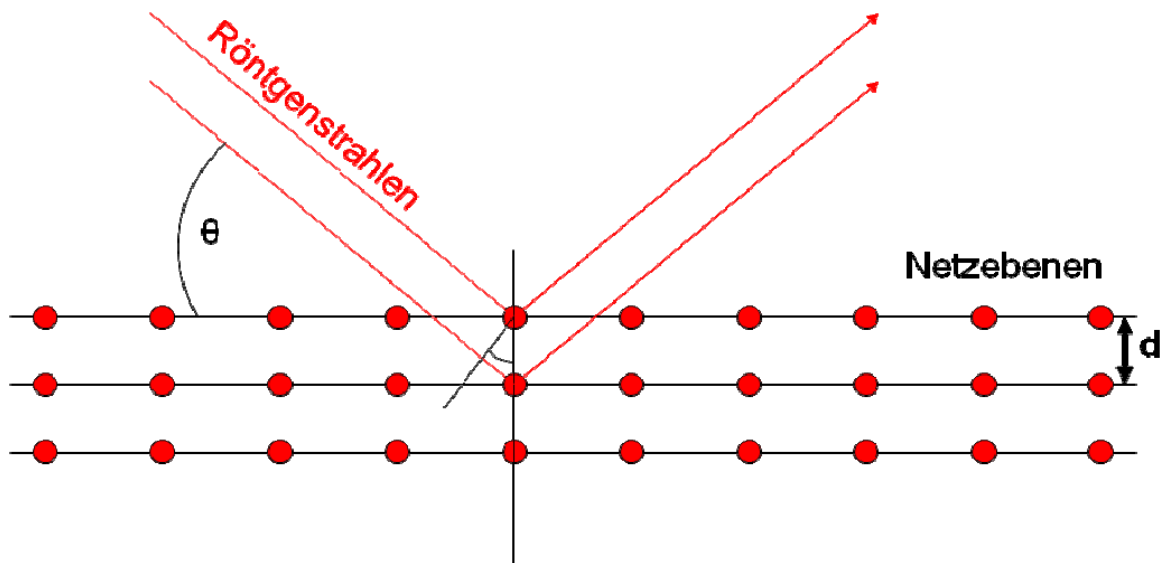


Abbildung 91: Bragg'sche Beugung von Röntgenstrahlen am Kristallgitter.

Als Detektor dient ein ortsempfindlicher Proportionalzähler für schnelle Aufnahmen oder ein Szintillationszähler für eine bessere Winkelauflösung. Geräte, die nach diesem Prinzip arbeiten, werden Diffraktometer genannt.

Röntgenmessungen an Pulvern sind leicht durchzuführen, sie sind zerstörungsfrei und es werden nur kleine Mengen (ca. 50 mg) benötigt. Die Probenformen können unterschiedlich sein. Die Messung lässt sich in Kapillaren oder auch zwischen zwei Polymerfolien durchführen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Röntgendiffraktogramme wurden an einem STOE-Diffraktometer mit $\text{Cu K}_{\alpha 1}$ -Strahlung und einer Wellenlänge von $\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$ in Reflektion gemessen. Der Messbereich ging von $5^\circ 2\theta$ bis $70^\circ 2\theta$.

4.3.7 Lyophilisation (Gefriertrocknung)

Die Methode der Lyophilisation dient einer schonenden Trocknung von empfindlichen Substanzen, angefangen bei Lebensmitteln bis hin zu biologischen Proben und Pharmazeutika [256]. Das Charakteristikum der Gefriertrocknung ist die Entfernung des Wassers aus der Probe, aus dem gefrorenen Zustand heraus. An die Stelle des normalen Phasenübergangs fest/flüssig/gasförmig, tritt die Sublimation fest/gasförmig. Da sich über dem Gefriergut immer ein gewisser Dampfdruck des Wassers einstellt, besteht das Prinzip darin, diese Moleküle aus dem Trockenraum zu entfernen, da der Dampfdruck über der Probe bei konstanten Bedingungen ebenfalls konstant bleibt. Eine Anlage zur Gefriertrocknung besteht immer aus einer Kammer mit dem Trockengut und einem Kondensator. Der Kondensator ist in der Regel eine gekühlte Rohrschlange, an der das Wasser aus der Atmosphäre kondensiert. Der Ablauf einer Trocknung teilt sich in Haupttrocknung und Nachtrocknung. Bei der Haupttrocknung wird das Wasser entfernt, welches in der ausgedehnten Phase vorliegt; in diesem Fall hier das Wasser, welches zwischen den einzelnen Kolloiden ist. Die Bedingungen hierbei sind ein Vakuum von 1 mbar und eine Temperatur unterhalb des Gefrierpunkts. Die Kammer wird dabei ständig geheizt, um die Sublimationsenthalpie des Wassers auszugleichen. Die Nachtrocknung findet bei höherem Vakuum (0,001 mbar) und höheren Temperaturen (30 °C) statt. Dies dient der Entfernung von adsorbiertem Wasser innerhalb der Probe vor allem dem im Kolloid enthaltenem Wasser. Die Dauer einer solchen Trocknung variiert je nach Probenmenge und gewünschter Temperatur, je 24 Stunden für Haupt- und Nachtrocknung sind aber die Regel.

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzte Apparatur zur Gefriertrocknung war ein Christ Alpha 2-4 LSC. Die Haupttrocknung lief ab bei 0,1 mbar und 0 °C, die Nachtrocknung bei 0,001 mbar und 20 °C. Die Dauer betrug jeweils 24 Stunden.

4.3.8 Thermogravimetrie

Die Thermogravimetrische Analyse (TGA) dient der Beobachtung der Masseänderung einer Probe im Verlauf eines Temperaturprofils. Der Verlauf der Massenveränderung gibt dabei Aufschluss über die Zusammensetzung der Probe. Hierzu wird eine Probe in einem Ofen bei einer konstanten Heizrate erhitzt. Der Tiegel für die Probe besteht aus einem hochschmelzenden Material wie z.B. Aluminiumoxid (Korund). Der Tiegelhalter ist weiterhin an eine Mikrowaage gekoppelt, die die Massenänderung kontinuierlich misst. Die Analyse lässt sich sowohl unter Inertgas-Atmosphäre wie Argon oder auch Sauerstoff durchführen. Ein Massenverlust der Probe kann z.B. durch Verdampfung, Zersetzung oder Reduktion auftreten. Unter Sauerstoff ließe sich auch eine Massenzunahme durch Oxidation feststellen. Die Kopplung der entweichenden Gase an ein Massenspektrometer oder ein IR-Spektrometer lassen Rückschlüsse auf die Zusammensetzung der sich zersetzenden Substanz zu.

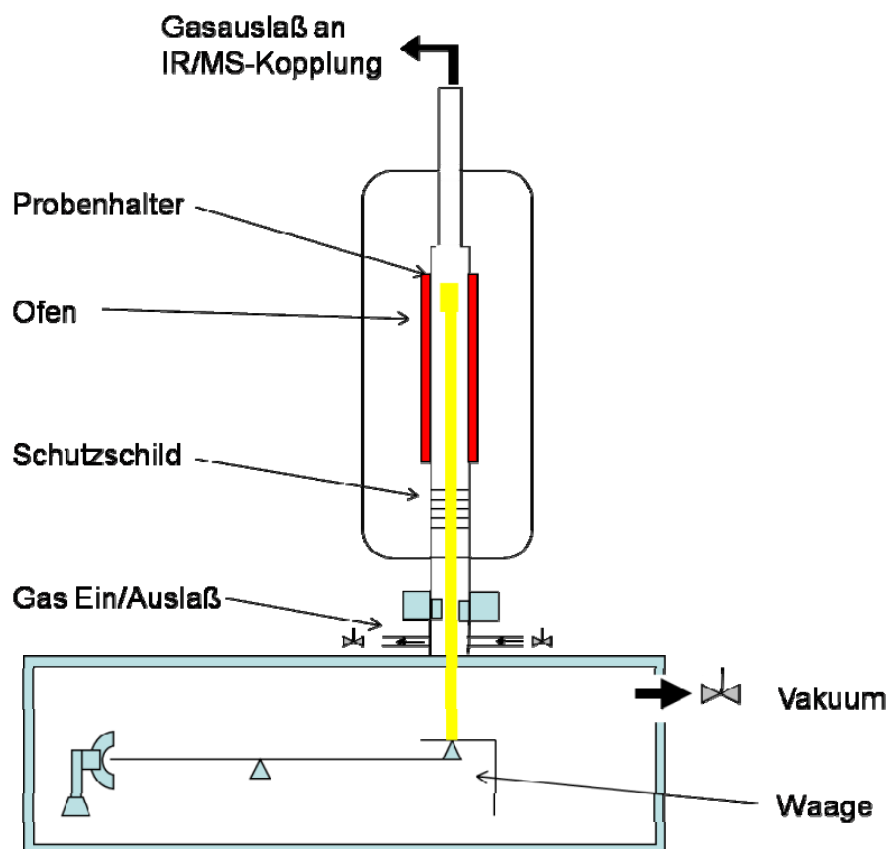


Abbildung 92: Schematische Darstellung einer TG mit IR- oder MS-Kopplung.

4.3.9 Durchfluß-Zytometrie (FACS)

Die Bezeichnung der Durchflusszytometrie als FACS (*fluorescence activated cell sorting*) ist gängig, bezieht sich aber eigentlich auf den geschützten Markennamen für solch ein System der Firma Becton Dickinson (BD). Weiterhin ist das Kürzel irreführend, da keine Zellen sortiert werden, sondern aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenz eine Messung ihrer Eigenschaften durchgeführt wird.

Das Prinzip beruht auf einem optischen Signal, wenn eine Zelle den Laserstrahl passiert. Die in Lösung befindlichen Zellen werden über eine Kapillare am Laserstrahl vorbei gespült. Die Zellen, die ein entsprechendes fluoreszierendes Protein enthalten, werden detektiert und statistisch erfasst. Es lässt sich eine statistische Unterteilung in leuchtend oder nichtleuchtend vornehmen, oder in welcher Farbe die Zelle überhaupt fluoresziert. Die Geschwindigkeit dieser Zählweise beträgt in der Regel 1000 Zellen pro Sekunde. Solch eine Methode ist einer manuellen Auszählung im Fluoreszenzmikroskop deutlich überlegen. Die in dieser Arbeit verwendeten FACS-Daten stammen von einem FACSCalibur™ Durchflußzytometer (BD-Biosciences, Heidelberg) und wurden in Kooperation mit Prof. Dr. M. Köller an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt.

4.3.10 Kritisch-Punkt-Trocknung (CPD: critical point drying)

Dieses physikalische Verfahren macht sich, wie auch die Gefriertrocknung, die Umgehung eines Phasenübergangs zu Nutze. In diesem Fall wird das Lösungsmittel über seinen kritischen Punkt hinaus gebracht (Abbildung 93).

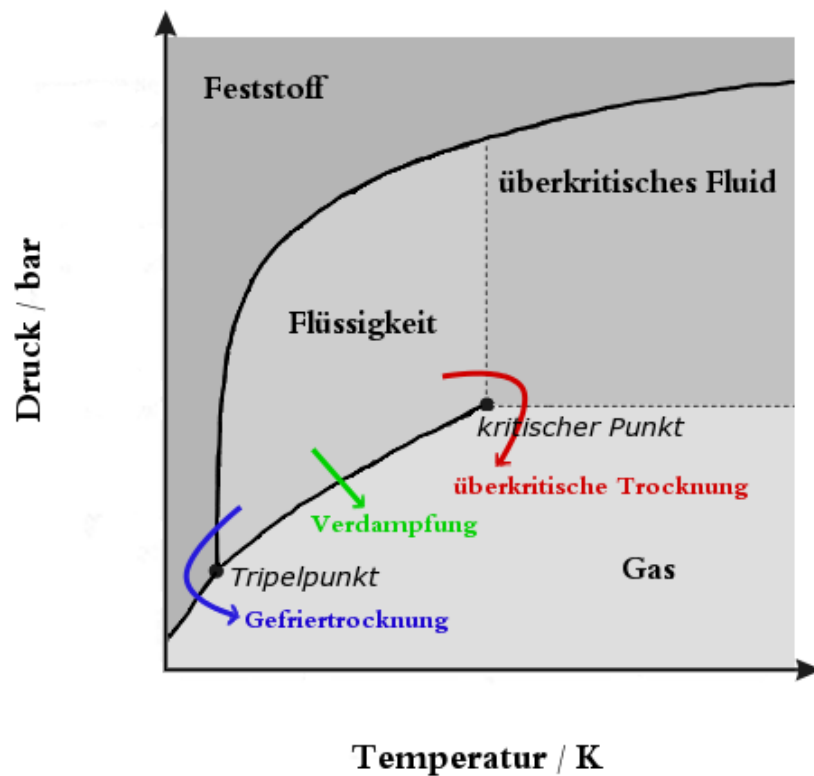


Abbildung 93: Phasendiagramm eines Stoffes mit den charakteristischen Punkten (Q.: Creative Commons Attribution Sharealike 2.5 License).

Dieses Verfahren ist besonders nützlich, um empfindliche organische Proben wie Gewebe zu trocknen, um sie im REM untersuchen zu können. Die Problematik einer schlichten Verdampfung von Wasser aus dem Gewebe führt zu verschiedenen unerwünschten Effekten an der Probe. Neben Schrumpfung können Risse und Porenvergrößerungen eintreten, die die Morphologie nachhaltig zerstören. Als Medium ist Kohlenstoffdioxid für diesen Prozess hervorragend geeignet. Der Nachteil liegt hierbei in der Nicht-Mischbarkeit mit Wasser, was bei organischem Gewebe ein großer Nachteil ist. Zur Lösung dieses Problems wird die Probe zunächst mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von Aceton entwässert. Dieses wiederum ist sehr gut mit CO_2 mischbar. Nach dem Überführen der Probe in 100 %iges Aceton wird diese im Gerät auf 10°C abgekühlt und das Aceton mit flüssigem CO_2 ausgetauscht. Danach wird die Temperatur langsam auf überkritische Werte angehoben (ca.

37 °C). Bei Überschreiten des kritischen Punktes ist das Präparat trocken. Nach langsamem Ablassen des Gases kann das Trockengut entnommen werden. In diesem Fall erfolgte noch die Besputterung mit Gold/Palladium-Legierung und die Untersuchung im REM.

4.3.11 Infrarot-Spektroskopie (IR)

Das Prinzip der IR-Spektroskopie ist die Anregung von Molekülschwingungen und rotationen durch Strahlung im infraroten Bereich. Hierdurch ergeben sich zwei Möglichkeiten der Messung solcher Strahlungsadsorption:

- 1: direkt als Adsorption von IR-Strahlen
- 2: indirekt als Streustrahlung im Raman-Spektrometer.

Die Bandenlage im IR-Spektrum kann entweder in der entsprechenden Wellenlänge λ angegeben werden oder in der gebräuchlicheren Form der reziproken Wellenlänge, der Wellenzahl $\tilde{\nu}$ mit der Einheit cm^{-1} . Dieser Zahlenwert gibt an, wie viele Wellen der IR-Strahlung auf einen Zentimeter kommen.

$$\tilde{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad \text{Gleichung 11}$$

Die Einheit Wellenzahl hat gegenüber der Wellenlänge den Vorteil, dass sie der Frequenz ν der adsorbierten Strahlung und der Energie ΔE direkt proportional ist. Hierfür gilt:

$$\lambda \cdot \nu = c \quad \text{Gleichung 12}$$

$$\nu = \frac{c}{\lambda} = c \cdot \tilde{\nu} \quad \text{Gleichung 13}$$

$$\Delta E = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} = h \cdot c \cdot \tilde{\nu} \quad \text{Gleichung 14}$$

$$\Delta E \sim \tilde{\nu} \quad \text{Gleichung 15}$$

Mit c : Lichtgeschwindigkeit

h : Planck'sche Konstante

ν : Frequenz

λ : Wellenlänge

$\tilde{\nu}$: Wellenzahl.

Der Bereich mit den für die Analyse benötigten Signalen liegt in der Regel zwischen 400 und 4000 Wellenzahlen (cm^{-1}). Damit ein Molekül überhaupt IR-aktiv ist, muss es ein Dipol-Moment besitzen. Wasser als Beispiel ist gewinkelt und besitzt ein Dipolmoment. Beim CO_2 entsteht das Dipolmoment bei einer asymmetrischen Deformationsschwingung. Da solche Schwingungen für funktionelle Gruppen im Molekül spezifisch sind, lassen sich mit der IR-Spektroskopie vor allem in der organischen Chemie schnell und zuverlässig bestimmte Molekülteile identifizieren. Bei intensiverer Betrachtung des Spektrums, vor allem dem „Fingerprint Bereich“ zwischen 400 und 1000 cm^{-1} , lässt sich auch zuverlässig die Substanz selbst bestimmen.

Die in dieser Arbeit angefertigten Spektren wurden an einem Perkin-Elmer 1720X IR-Spektrometer aufgenommen. Die Proben wurden dazu mit KBr verrieben und gepresst.

5 Zusammenfassung

Als Resümee der Arbeit kann gezogen werden, dass das Ziel zur Entwicklung einer transfizierenden Implantatbeschichtung voll erreicht wurde. Das System zur Synthese von Calciumphosphat-Nanopartikeln, die sphärisch sind, als dominierende Phase im Inneren Hydroxylapatit besitzen und durch die Wahl der Trocknungsmethode eine einstellbare Kristallinität aufweisen, ist einfach und gut reproduzierbar. Weiterhin kann in diesem modularen Aufbau, wenn gewünscht, eine zusätzliche Funktionalisierung auf die Kolloide aufgebracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene synthetische Polymere sowie das Biomolekül DNA eingesetzt. Die Polymere sind in der Lage, je nach gewähltem Dispersionsmittel, eine stabile und lagerfähige Dispersion der Partikel zu ermöglichen. Die HRTEM-Untersuchungen ergaben für 180 d in 2-Propanol gelagerte Kolloide keinen Unterschied in der Morphologie und Kristallinität, im Vergleich zu frisch synthetisierten Präzipitaten. Die Trocknungsmethode liefert nanokristalline Partikel, wenn das Präzipitat nach der Filterung mit 2-Propanol gewaschen und anschließend an Luft getrocknet wird. Ein sofortiges Einfrieren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ und anschließende Lyophilisation führt zu Partikeln identischer Morphologie, die jedoch im Gegensatz zu den an Luft getrockneten Kolloiden völlig amorph sind. Die Stöchiometrie der Partikelzusammensetzung bleibt hierbei erhalten. Eine Trocknung der Partikel an Luft ohne vorherige Waschung mit Alkohol führt zu völlig agglomerierten Materialien, die sich nicht mehr in Dispersion bringen lassen. Eine Erklärung hierfür liefert die Theorie, dass der hydratisierte Rand des Kolloids beim Trocknen kristallisiert und die Nanopartikel irreversibel miteinander verknüpft.

Die Methode der elektrophoretischen Beschichtung ermöglicht es, mit empfindlichen Substanzen funktionalisierte Nanopartikel auf polarisierbare Substrate aufzubringen. So ließen sich mit Pharmazeutika beladene Implantatbeschichtungen realisieren. Im Gegensatz zu einer Plasma-Spray-Beschichtung ist die hier resultierende Schicht mit einer wesentlich geringeren Oberflächenhaftung ausgestattet. Eine Anwendung fände sich hier eher in der kontrollierten Wirkstofffreisetzung und nicht in der Verbesserung der Implantathaftung.

Die Synthese eines PEI-funktionalisierten, kationischen Kolloids eröffnete die Möglichkeit zur weiteren Funktionalisierung mit negativ geladener DNA. Die so dargestellten Partikel konnten für die elektrophoretische Beschichtungsmethode genutzt werden. Die auf diese Weise hergestellten Beschichtungen wiesen in den Transfektionsuntersuchungen eine Effizienz auf, die weit über dem gegenwärtigen Stand der Technik liegt. Da im Gegensatz zu den in der Literatur bekannten PEI/DNA Präzipitaten hier die Hauptmasse des Materials aus Calciumphosphat besteht, ist die zytotoxische Wirkung des PEI erheblich verringert. Tote Zellen konnten in den Zellexperimenten nicht gefunden werden; direkt nachgewiesen mit einem MTT-Test wurden sie allerdings auch nicht. Um eventuell vorhandene Toxizitäten des verwendeten Polymers weiter zu analysieren, sollte dieses System noch untersucht werden. Eine Variation der Kettenlänge des Polyethylenimin und die Verwendung anderer Zelllinien bieten sich hierfür an. Die noch stark schwankenden Daten zur Transfektionseffizienz erklären sich aus der Methode des Nachweises. Da auch die Zellen als nicht erfolgreich transfiziert gezählt werden, die keinen Kontakt zum Substrat haben, verringert dies die Effizienz erheblich. Es ist davon auszugehen, dass die reale Effizienz der dargestellten Substrate nahe 100 % liegt. Eine weitere Untersuchung dieses erfolgversprechenden Ansatzes kann in Zukunft die statistischen Daten erhärten und Vergleiche zu anderen Zelllinien aufstellen. Sehr interessant wäre auch die Beantwortung der Fragestellung, ob sich mit diesem System auch pflanzliche Zellen transfizieren lassen. Normalerweise sind Nanopartikel nicht in der Lage, die starre Zellwand zu durchdringen [257]. Eine industrielle Anwendung in der Biotechnologie wäre ebenfalls eine interessante Alternative.

6 Literatur

1. Williams, D.F., ed. *Medical and dental materials*. Materials Science and Technology, ed. R.W. Cahn, P. Haasen, and E.J. Kramer. Vol. 14. 1992, VCH: Weinheim. 469.
2. Hall, R.M. and A. Unsworth, *Friction in hip prostheses*. Biomaterials, 1997. **18**: p. 1017-1026.
3. Antonietti, M. and C. Göltner, *Überstrukturen funktioneller Kolloide: eine Chemie im Nanometerbereich*. Angew. Chem., 1997. **109**: p. 944-947.
4. Bourgeat-Lami, E., *Organic-inorganic nanostructured colloids*. J. Nanosci. Nanotechnol., 2002. **2**: p. 1-23.
5. Caruso, F., *Colloids and Colloid Assemblies*. 2004, Weinheim: Wiley-VCH.
6. Diao, J. and D.W. Fuerstenau, *Characterization of the wettability of solid particles by film flotation 2. Theoretical analysis*. Coll. Surf., 1991. **60**: p. 145-160.
7. Everett, D.H., *Basic Principles of Colloid Science*. 1988, London: Royal Society of Chemistry.
8. Ofir, P.B.Y., et al., *The influence of polyelectrolytes on the formation and phase transformation of amorphous calcium phosphate*. Cryst. Growth & Design, 2004. **4**: p. 177-183.
9. Bar-Yosef Ofir, P., et al., *The influence of polyelectrolytes on the formation and phase transformation of amorphous calcium phosphate*. Cryst. Growth & Design, 2004. **4**: p. 177-183.
10. Michenfelder, M., et al., *Characterization of two molluscan crystal-modulating biomineralization proteins and identification of putative mineral binding domains*. Biopolymers, 2003. **70**: p. 522-533.
11. Tsortos, A. and G.H. Nancollas, *The role of polycarboxylic acids in calcium phosphate mineralization*. J. Colloid Interface Sci., 2002. **250**: p. 159-167.
12. Reddy, M.M. and A.R. Hoch, *Calcite crystal growth rate inhibition by polycarboxylic acids*. J. Coll. Interf. Sci., 2001. **235**: p. 365-370.
13. Koutsopoulos, S. and E. Dalas, *Hydroxyapatite crystallization in the presence of amino acids with uncharged polar side groups: glycine, cysteine, cystine, and glutamine*. Langmuir, 2001. **17**: p. 1074-1079.
14. Jahnen-Dechent, W., et al., *Systemic inhibition of spontaneous calcification by the serum protein α_2 -HS glycoprotein/fetuin*. Z. Kardiol., 2001. **90**:Suppl. **3**: p. III/47-III/56.
15. Koutsopoulos, S. and E. Dalas, *Hydroxyapatite crystallization in the presence of serine, tyrosine and hydroxyproline amino acids with polar side groups*. J. Cryst. Growth, 2000. **216**: p. 443-449.
16. Koutsopoulos, S. and E. Dalas, *The effect of acidic amino acids on hydroxyapatite crystallization*. J. Cryst. Growth, 2000. **217**: p. 410-415.

17. Jin, D.H., et al., *Inhibitory effect of protein hydrolysates on calcium carbonate crystallisation*. J. Agric. Food Chem., 2000. **48**: p. 5450-5454.
18. Hoch, A.R., M.M. Reddy, and G.R. Aiken, *Calcite crystal growth inhibition by humic substances with emphasis on hydrophobic acids from the Florida Everglades*. Geochim. Cosmochim. Acta, 2000. **64**: p. 61-72.
19. Dörfler, H.-D., *Grenzflächen und kolloid-disperse Systeme*. 2002, Berlin: Springer.
20. Adamczyk, Z. and P. Weroniski, *Applications of the DLVO theory for particle deposition problems*. Adv. Colloid Interface Sci., 1999. **83**: p. 137-226.
21. Zsigmondy, R. and H. Siedentopf, *Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser*. Ann. Phys. Leipzig Ser. 4, 1903. **10**: p. 1-39.
22. Addadi, L., et al., *Structural control over the formation of calcium carbonate mineral phases in biomineralization*, in *Supramolecular Stereochemistry*, J.S. Siegel, Editor. 1995, Kluwer Academic Publishers. p. 127-139.
23. Aizenberg, J., et al., *Stabilization of amorphous calcium carbonate by specialized macromolecules in biological and synthetic precipitates*. Adv. Mater., 1996. **8**: p. 222-226.
24. Beniash, E., et al., *Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth*. Proc. R. Soc. London B, 1997. **264**: p. 461-465.
25. Bielefeld, U. and W. Becker, *Embryonic development of the shell in Biomphalaria glabrata (Say)*. Int. J. Dev. Biol., 1991. **35**: p. 121-131.
26. Falini, G., et al., *Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules*. Science, 1996. **271**: p. 67-69.
27. Greenaway, P., *Calcium balance and moulting in the crustacea*. Biol. Rev., 1985. **60**: p. 425-454.
28. Atkins, P.A. and J.A. Beran, *Chemie - einfach alles*. 1998, Weinheim: Wiley-VCH. 993.
29. Hancox, N.M., *Biology of bone*. 1972, Cambridge: Cambridge University Press. 1-199.
30. Robinson, R.A., *Physicochemical structure of bone*. Clin. Orthop., 1975. **112**: p. 263-315.
31. Robinson, R.A., *Bone tissue: composition and function*. John Hopkins Med. J., 1979. **145**: p. 10-24.
32. Doi, Y., et al., *Formation of apatite-collagen complexes*. J. Biomed. Mater. Res., 1996. **31**: p. 43-49.

33. Reddi, A.H., *Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration*. Nature Biotechnology, 1998. **16**: p. 247-252.
34. Cheung, H.S. and M.H. Haak, *Growth of osteoblasts on porous calcium phosphate ceramic: an in vitro model for biocompatibility study*. Biomaterials, 1989. **10**: p. 63-67.
35. Puleo, D.A., et al., *Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro*. J. Biomed. Mater. Res., 1991. **25**: p. 711-723.
36. Ishaug, S.L., et al., *Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers*. J. Biomed. Mater. Res., 1994. **28**: p. 1445-1453.
37. Keller, J.C., et al., *In vitro attachment of osteoblast-like cells to osteoceramic materials*. Dental Mater., 1997. **13**: p. 62-68.
38. Franz-Odenaal, T.A., B.K. Hall, and P.E. Witten, *Buried alive: How osteoblasts become osteocytes*. Dev. Dynam., 2006. **235**: p. 176-190.
39. Vaes, G., *Cellular biology and biochemical mechanism of bone resorption*. Clin. Orthoped. and Rel. Res., 1988. **231**: p. 239-271.
40. Teitelbaum, S.L., M.M. Tondravi, and F.P. Ross, *Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption*. J. Leucocyte Biol., 1997. **61**: p. 381-388.
41. Ramsay, J.B. and C.D. Wilga, *Morphology and mechanics of the teeth and jaws of white-spotted bamboo sharks (Chiloscyllium plagiosum)*. J. Morphol., 2007. **268**(8): p. 664-682.
42. Mandernack, K.W., et al., *Oxygen and iron isotope studies of magnetite produced by magnetotactic bacteria*. Science, 1999. **285**(5435): p. 1892-1896.
43. Schneider, P.M., L.B. Messer, and W.H. Douglas, *The effect of enamel surface reduction in vitro on the bonding of composite resin to permanent human enamel*. J. Dent. Res., 1981. **60**: p. 895-900.
44. Lippert, F., D.M. Parker, and K.D. Jandt, *In vitro demineralization/remineralization cycles at human tooth enamel surfaces investigated by AFM and nanoindentation*. J. Coll. Interf. Sci., 2004. **280**: p. 442-448.
45. Williams, V.D. and C.W. Svare, *The effect of five-year storage prior to bonding on enamel/composite bond strength*. J. Dent. Res., 1985. **64**: p. 151-154.
46. Zaidel-Bar, R., et al., *Hierarchical assembly of cell-matrix adhesion complexes*. Biochem. Soc. Trans., 2004: p. 416-420.
47. Ainslie, K.M., et al., *Cell adhesion on nanofibrous polytetrafluoroethylene (nPTFE)*. Langmuir, 2007. **23**: p. 747-754.
48. Arntz, Y., et al., *Polymers in biomaterials science: from surface functionalisation to tissue engineering*. Actualite Chimique, 2007. **310**: p. 20.

49. Curtis, A.S.G., et al., *Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings*. IEEE Trans. Nanobiosc., 2004. **3**: p. 61-65.
50. Dobkowski, J., et al., *Cell adhesion to polymeric surfaces: experimental study and simple theoretical approach*. J. Biomed. Mater. Res., 1999. **47**: p. 234-242.
51. Kivi, N., et al., *Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression*. Oncogene, 2008. **27**: p. 2532-2541.
52. Mitra, S., D.A. Hanson, and D.D. Schlaepfer, *Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility*. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol., 2005. **6**: p. 56-68.
53. Marquez, M.G., et al., *Raft-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PI-4,5-P2) is essential for the maintenance of mature focal adhesion (FA) plaques*. Chem. Phys. Lipids, 2005. **136**(2): p. 143-143.
54. Mercer, R.R. and A.M. Mastro, *Cytokines secreted by bone-metastatic breast cancer cells alter the expression pattern of f-actin and reduce focal adhesion plaques in osteoblasts through PI3K*. Exp. Cell. Res., 2005. **310**(2): p. 270-281.
55. Rilla, K., et al., *Changed lamellipodial extension, adhesion plaques and migration in epidermal keratinocytes containing constitutively expressed sense and antisense hyaluronan synthase 2 (Has2) genes*. J. Cell Sci., 2002. **115**(18): p. 3633-3643.
56. Shoeman, R.L., et al., *Organization of focal adhesion plaques is disrupted by action of the HIV-1 protease*. Cell Biol. Int., 2002. **26**(6): p. 529-539.
57. Miyagi, N., et al., *Efficient and durable gene transfer to transplanted heart using adeno-associated virus 9 vector*. J. Heart Lung Transplant., 2008. **27**: p. 554-560.
58. Kawano, R., et al., *Transduction of full-length dystrophin to multiple skeletal muscles improves motor performance and life span in utrophin/dystrophin double knockout mice*. Mol. Ther., 2008. **16**: p. 825-831.
59. Hioki, H., et al., *Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters*. Gene Ther., 2007. **14**: p. 872-882.
60. Hachiya, A., et al., *Gene transfer in human skin with different pseudotyped HIV-based vectors*. Gene Ther., 2007. **14**: p. 648-656.
61. Jakobsson, J., et al., *Efficient transduction of neurons using Ross River glycoprotein-pseudotyped lentiviral vectors*. Gene Ther., 2006. **13**: p. 966-973.
62. Gong, Y.S., et al., *Retroviral gene transfer of tissue-type plasminogen activator targets thrombolysis in vitro and in vivo*. Gene Ther., 2007. **14**: p. 1537-1542.

63. Jiang, Q., et al., *Retroviral transduction of IL-7R alpha into IL-7R alpha(-/-) bone marrow progenitors: correction of lymphoid deficiency and induction of neutrophilia*. *Gene Ther.*, 2005. **12**: p. 1761-1768.
64. Hiasa, A., et al., *Long-term phenotypic, functional and genetic stability of cancer-specific T-cell receptor (TCR) alpha beta genes transduced to CD8(+) T cells*. *Gene Ther.*, 2008. **15**: p. 695-699.
65. Hart, D.P., et al., *Retroviral transfer of a dominant TCR prevents surface expression of a large proportion of the endogenous TCR repertoire in human T cells*. *Gene Ther.*, 2008. **15**: p. 625-631.
66. White, S.J., et al., *In vitro and in vivo analysis of expression cassettes designed for vascular gene transfer*. *Gene Ther.*, 2008. **15**: p. 340-346.
67. Eggermann, M., et al., *Effect of BMP-2 gene transfer on bone healing in sheep*. *Gene Ther.*, 2006. **13**: p. 1290-1299.
68. Varga, C.M., et al., *Quantitative comparison of polyethylenimine formulations and adenoviral vectors in terms of intracellular gene delivery processes*. *Gene Ther.*, 2005. **12**: p. 1023-1032.
69. Natkunarajah, M., et al., *Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8*. *Gene Ther.*, 2008. **15**: p. 463-467.
70. Hasbrouck, N.C. and K.A. High, *AAV-mediated gene transfer for the treatment of hemophilia B: problems and prospects*. *Gene Ther.*, 2008. **15**: p. 870-875.
71. Cecchini, S., A. Negrete, and R.M. Kotin, *Toward exascale production of recombinant adeno-associated virus for gene transfer applications*. *Gene Ther.*, 2008. **15**: p. 823-830.
72. Zhao, W., et al., *Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer: role of a cellular serine/threonine protein phosphatase in augmenting transduction efficiency*. *Gene Ther.*, 2007. **14**: p. 545-550.
73. Sipo, I., et al., *Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction*. *Gene Ther.*, 2007. **14**: p. 1319-1329.
74. Le, L.P., et al., *Infectivity enhancement for adenoviral transduction of canine osteosarcoma cells*. *Gene Ther.*, 2006. **13**: p. 389-399.
75. Goodrich, L.R., et al., *Direct adenovirus-mediated IGF-I gene transduction of synovium induces persisting synovial fluid IGF-I ligand elevations*. *Gene Ther.*, 2006. **13**: p. 1253-1262.
76. Ezquer, F., M.T. Nunez, and Y. Israel, *Antisense gene delivered by an adenoassociated viral vector inhibits iron uptake in human intestinal cells: Potential application in hemochromatosis*. *Biochem. Pharmacol.*, 2005. **69**: p. 1159-1566.

77. Goncalves, M., et al., *Stable transduction of large DNA by high-capacity adeno-associated virus/adenovirus hybrid vectors*. Virology, 2004. **321**: p. 287-296.
78. Curiel, D.T., et al., *Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991. **88**: p. 8850-8854.
79. Graham, F.L. and A.J. van der Eb, *A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA*. Virology, 1973. **52**: p. 456-467.
80. Zhou, R., et al., *Electroporation-mediated transfer of plasmids to the lung results in reduced TLR9 signaling and inflammation*. Gene Ther., 2007. **14**: p. 775-780.
81. McNeil, S.E. and Y. Perrie, *Gene delivery using cationic liposomes*. Expert Opin. ther. pat., 2006. **16**: p. 1371-1382.
82. Torchilin, V., *Fluorescence microscopy to follow the targeting of liposomes and micelles to cells and their intracellular fate*. Adv. Drug. Deliv. Rev., 2005. **57**: p. 95-109.
83. Abe, A., A. Miyanohara, and T. Friedmann, *Enhanced gene transfer with fusogenic liposomes containing vesicular stomatitis virus G glycoprotein*. J. Virol., 1998. **72**: p. 6159-6163.
84. Thierry, A.R., et al., *Characterization of liposome-mediated gene delivery: expression, stability, and pharmacokinetics of plasmid DNA*. Gene Ther., 1997. **4**: p. 226-237.
85. Jacobs, F., et al., *Direct comparison of hepatocyte-specific expression cassettes following adenoviral and nonviral hydrodynamic gene transfer*. Gene Ther., 2008. **15**: p. 594-603.
86. Akagi, D., et al., *Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation*. Gene Ther., 2007. **14**: p. 1029-1038.
87. Thomas, M., et al., *Cross-linked small polyethylenimines: While still nontoxic, deliver DNA efficiently to mammalian cells in vitro and in vivo*. Pharm. Res., 2005. **22**: p. 373-380.
88. Thomas, M. and A.M. Klibanov, *Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2003. **62**(1): p. 27-34.
89. Wagner, E., et al., *Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells*. Biochemistry, 1990. **87**: p. 3410-3414.
90. Cotten, M., et al., *Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: Stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels*. Biochemistry, 1990. **87**: p. 4033-4037.

91. Russ, V., et al., *Novel degradable oligoethylenimine acrylate ester-based pseudodendrimers for in vitro and in vivo gene transfer*. Gene Ther., 2008. **15**: p. 18-29.
92. Sokolova, V. and M. Eppele, *Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells*. Angew. Chem., 2007. **120**: p. 1402-1416.
93. Padilla Mondejar, S., A. Kovtun, and M. Eppele, *Lanthanide-doped calcium phosphate nanoparticles with high internal crystallinity and with a shell of DNA as fluorescent probes in cell experiments*. J. Mater. Chem., 2007. **17**: p. 4153-4159.
94. Oyane, A., H. Tsurushima, and A. Ito, *Novel gene-transferring scaffolds having a cell adhesion molecule-DNA-apatite nanocomposite surface*. Gene Ther., 2007. **14**: p. 1750-1753.
95. Olton, D., et al., *Nanostructured calcium phosphates (NanoCaPs) for non-viral gene delivery: Influence of the synthesis parameters on transfection efficiency*. Biomaterials, 2007. **28**: p. 1267-1279.
96. Liu, Z., et al., *siRNA delivery into human T cells and primary cells with carbon-nanotube transporters*. Angew. Chem., 2007. **119**: p. 2069-2073.
97. Brisson, M. and L. Huang, *Improved gene delivery formulations and expression systems for enhanced transfection efficiency*. J. Pure Appl. Chem., 1998. **70**: p. 83-88.
98. Fischer, D., et al., *Cationized human serum albumin as a non-viral vector system for gene delivery? Characterization of complex formation with plasmid DNA and transfection efficiency*. Int. J. Pharm., 2001. **225**: p. 97-111.
99. Kodama, K., et al., *The features and shortcomings for gene delivery of current non-viral carriers*. Curr. Med. Chem., 2006. **13**: p. 2155-2161.
100. Puebla, I., et al., *A recombinant H1 histone-based system for efficient delivery of nucleic acids*. J. Biotechnol., 2003. **105**: p. 215-226.
101. Seruga, I., et al., *High transfection efficiency of human umbilical vein endothelial cells using an optimized calcium phosphate method*. Anal. Biochem., 2001. **296**: p. 143-147.
102. Sharma, V.K., M. Thomas, and A.M. Klibanov, *Mechanistic studies on aggregation of polyethylenimine-DNA complexes and its prevention*. Biotechnol. Bioeng., 2005. **90**: p. 614-620.
103. Urabe, M., et al., *DNA/calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable and maintain high transfection efficiency*. Anal. Biochem., 2000. **278**: p. 91-92.
104. Yu, W., et al., *Enhanced transfection efficiency of a systemically delivered tumor-targeting immunolipoplex by inclusion of a pH-sensitive histidylated oligolysine peptide*. Nucleic Acids Res., 2004. **32**: p. e48 - e48.

105. Bhat, B.M., et al., *Evidence of in vivo osteoinduction in adult rat bone by adeno-Runx2 intra-femoral delivery*. J. Cell. Biochem., 2008. **103**: p. 1912-1924.
106. Somia, N. and I.M. Verma, *Gene therapy: Trials and tribulations*. Nature Rev. Gen., 2000. **1**: p. 91-99.
107. Zallen, D.T., *US gene therapy in crisis*. TIG, 2000. **16**: p. 272-275.
108. Alexander, I.E., et al., *Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease*. Gene Ther., 2008. **15**: p. 831-839.
109. Buch, P.K., J.W. Bainbridge, and R.R. Ali, *AAV-mediated gene therapy for retinal disorders: from mouse to man*. Gene Ther., 2008. **15**: p. 849-857.
110. Moeller, L. and K. Wang, *Engineering with precision: Tools for the new generation of transgenic crops*. Bioscience, 2008. **58**: p. 391-401.
111. Chang, M.L., et al., *Gene gun bombardment with DNA-coated gold particles is a potential alternative to hydrodynamics-based transfection for delivering genes into superficial hepatocytes*. Hum. Gene Ther., 2008. **19**: p. 391-395.
112. Gaffal, E., et al., *CD11c+dermal DC but not epidermal Langerhans cells are required for efficient induction of CD8+CTL responses in the skin following gene gun immunization*. Exp. Dermatol., 2008. **17**: p. 260-260.
113. Radu, D.R., et al., *A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent*. J. Am. Chem. Soc., 2004. **126**: p. 13216-13217.
114. Azzam, T. and A.J. Domb, *Current development in gene transfection agents*. Curr. Drug Deliv., 2004. **1**: p. 165-193.
115. Nakanishi, M., *New strategy in gene transfection by cationic transfection lipids with a cationic cholesterol*. Curr. Med. Chem., 2003. **10**: p. 1289-1296.
116. Prabha, S., W.Z. Zhou, and V. Labhasetwar, *Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles*. Int. J. Pharm., 2002. **244**: p. 105-115.
117. Noguchi, A., N. Hirashima, and M. Nakanishi, *Cationic cholesterol promotes gene transfection using the nuclear localization signal in protamine*. Pharm. Res., 2002. **19**: p. 933-938.
118. Nchinda, G., K. Überla, and O. Zschörnig, *Characterization of cationic lipid DNA transfection complexes differing in susceptibility to serum inhibition*. BMC Biotechnology, 2002. **2**: p. 12.
119. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethyleneimine*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1995. **92**: p. 7297-7301.

120. Chen, J.L., et al., *Liposomes modified with polycation used for gene delivery: Preparation, characterization and transfection in vitro*. Int. J. Pharm., 2007. **343**(1-2): p. 255-261.
121. Hosseinkhani, H., et al., *Dextran-spermine polycation: an efficient nonviral vector for in vitro and in vivo gene transfection*. Gene Ther., 2004. **11**(2): p. 194-203.
122. Kawai, S. and M. Nishizawa, *NEW PROCEDURE FOR DNA TRANSFECTION WITH POLYCATION AND DIMETHYLSULFOXIDE*. Mol. Cell. Biol., 1984. **4**(6): p. 1172-1174.
123. Wang, Y.B., et al., *Induction of apoptosis and cell cycle arrest by polyvinylpyrrolidone K-30 and protective effect of α -tocopherol*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003. **308**: p. 878-884.
124. Ehrlich, M., et al., *Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits*. Cell, 2004. **118**: p. 591-605.
125. El Ouahabi, A., et al., *The role of endosome destabilizing activity in the gene transfer process mediated by cationic lipids*. FEBS Lett., 1997. **414**(2): p. 187-192.
126. Sokolova, V.V., et al., *Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles*. Biomaterials, 2006. **27**: p. 3147-3153.
127. Kakizawa, Y., et al., *Organic-inorganic hybrid-nanocarrier of siRNA constructing through the self-assembly of calcium phosphate and PEG-based block anionomer*. J. Controlled Release, 2006. **111**: p. 368-370.
128. Maitra, A., *Calcium-phosphate nanoparticles: second-generation nonviral vectors in gene therapy*. Expert Rev. Mol. Diagn., 2005. **5**: p. 893-905.
129. Gemeinhart, R.A., D. Luo, and W.M. Saltzman, *Cellular fate of a modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles*. Biotechnol. Prog., 2005. **21**: p. 532-537.
130. Luo, D., et al., *A self-assembled, modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles*. J. Controlled Release, 2004. **95**: p. 333-341.
131. Zhu, M.T., et al., *Comparative study of pulmonary responses to nano- and submicron-sized ferric oxide in rats*. Toxicology, 2008. **247**: p. 102-111.
132. de Freitas, E.R.L., et al., *In vitro biological activities of anionic gamma-Fe₂O₃ nanoparticles on human melanoma cells*. J. Nanosci. Nanotechnol., 2008. **8**: p. 2385-2391.
133. Krötz, F., et al., *Magnetofection - A highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo*. Mol. Ther., 2003. **7**: p. 700-710.
134. Jen, C.P., et al., *A nonviral transfection approach in vitro: the design of a gold nanoparticle vector joint with microelectromechanical systems*. Langmuir, 2004. **20**: p. 1369-1374.

135. Yang, Y.W. and J.C. Yang, *Calcium phosphate as a gene carrier: electron microscopy*. Biomaterials, 1997. **18**: p. 213-217.
136. Wilson, S.P., et al., *Optimization of calcium phosphate transfection for bovine chromaffin cells: relationship to calcium phosphate precipitate formation*. Anal. Biochem., 1995. **226**: p. 212-220.
137. Anil, V.S., et al., *A plant Ca^{2+} pump, ACA2, relieves salt hypersensitivity in yeast - Modulation of cytosolic calcium signature and activation of adaptive Na^+ homeostasis*. J. Biol. Chem., 2008. **283**: p. 3497-3506.
138. Gadsby, D.C., *Structural biology - Ion pumps made crystal clear*. Nature, 2007. **450**: p. 957-959.
139. Tadic, D., F. Peters, and M. Epple, *Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites*. Biomaterials, 2002. **23**: p. 2553-2559.
140. Tadic, D. and M. Epple, *Kontinuierliche Herstellung von Knochenmineral-ähnlichen Calciumphosphat-Keramiken*. Biomed. Technik, 2001: p. 224-225.
141. Tadic, D. and M. Epple, *Mechanically stable implants of synthetic bone mineral by cold isostatic pressing*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 4565-4571.
142. Welzel, T., W. Meyer-Zaika, and M. Epple, *Continuous preparation of monodisperse functionalised calcium phosphate nanoparticles with adjustable crystallinity*. Chem. Commun., 2004: p. 1204-1205.
143. Welzel, T., et al., *Transfection of cells with custom-made calcium phosphate nanoparticles coated with DNA*. J. Mater. Chem., 2004. **14**: p. 2213-2217.
144. Urch, H., *Diplomarbeit: Untersuchungen an funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln*. 2005, Universität Duisburg-Essen: Essen.
145. Ostwald, W., *Studien über die Bildung und Umwandlung von Festkörpern*. Z. Phys. Chem., 1897. **22**: p. 289-330.
146. Urch, H., et al., *Deposition of functionalized calcium phosphate nanoparticles on functionalized polymer surfaces*. Mat.-wiss. u. Werkstofftech., 2006. **37**: p. 422-425.
147. Hunter, R.J., *Zeta potential in colloid science*. 1988: Academic Press.
148. Urch, H., et al., *Preparation of two-dimensionally patterned layers of functionalised calcium phosphate nanoparticles by laser direct writing*. J. Mater. Chem., 2006. **16**: p. 1798-1802.
149. Xi, J., et al., *Properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) films modified with polyvinylpyrrolidone and behavior of MC3T3-E1 osteoblasts cultured on the blended films*. J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 2005. **16**: p. 1395-1408.
150. Lerner, E., R. Azoury, and S. Sarig, *Rapid precipitation of apatite from ethanol-water solution*. J. Cryst. Growth, 1989. **97**: p. 725-730.

151. Cai, K., et al., *Polysaccharide-protein surface modification of titanium via a layer-by-layer technique: Characterization and cell behaviour aspects*. Biomaterials, 2005. **26**: p. 5960-5971.
152. Merolli, A., et al., *Response to polyetherimide based composite materials implanted in muscle and in bone*. J. Mat. Sci. Mater. Med., 1999. **10**: p. 265-268.
153. Rey, C., et al., *Nanocrystalline apatites in biological systems: characterisation, structure and properties*. Materialwiss. Werkstofftech., 2007. **38**: p. 996-1002.
154. Cazalbou, S., C. Combes, and C. Rey, *Calcium Phosphate Bioceramics*. J. Aust. Ceram. Soc., 2004. **40**(1): p. 58-77.
155. Cazalbou, S., et al., *Processing of Ca-P Ceramics, Surface Characteristics and Biological Performance*. Key Eng. Mater., 2004. **254-256**: p. 833-836.
156. Tofighi, A., et al., *Setting Reactions Involved in Injectable Cements Based on Amorphous Calcium Phosphate*. Key Eng. Mater., 2001. **192-195**: p. 769-772.
157. Zhang, Y. and M. Zhang, *Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering*. J. Biomed. Mater. Res., 2001. **55**: p. 304-312.
158. Kleber, W., H.J. Bartsch, and J. Böhm, *Einführung in die Kristallographie*. 17. ed. 1990, München: Verlag Technik Berlin. 416.
159. Tsoli, M., et al., *Cellular uptake and toxicity of Au(55) clusters*. Small, 2005. **1**: p. 841-844.
160. Schmid, G., ed. *Nanoparticles. From Theory to Application*. 2004, Wiley-VCH: Weinheim.
161. Liu, Y.P., et al., *Gold-cluster degradation by the transition of B-DNA into A-DNA and the formation of nanowires*. Angew. Chem. Int. Ed., 2003. **42**: p. 2853-2857.
162. Jäger, C., et al., *A solid-state NMR investigation of the structure of nanocrystalline hydroxyapatite*. Magn. Reson. Chem., 2006. **44**: p. 573-580.
163. Doi, Y., et al., *Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures*. J. Biomed. Mater. Res., 1999. **47**: p. 424-433.
164. Doi, Y., et al., *Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes*. J. Biomed. Mater. Res., 1998. **39**: p. 603-610.
165. Tadic, D. and M. Epple, *Amorphous calcium phosphates as bone substitution materials*. Eur. J. Trauma, 2002. **28**: p. 136-137.
166. Suvorova, E.I. and H.E. Lundager Madsen, *Observation by HRTEM the hydroxyapatite-octacalcium phosphate interface in crystals grown from aqueous solution*. J. Cryst. Growth, 1999. **198/199**: p. 677-681.

167. Schalek, R.L. and L.T. Drzal, *Characterization of advanced materials using an environmental SEM*. J. Adv. Mat., 2000. **32**: p. 32-38.
168. Gai, P.L., *Development of Wet Environmental TEM (Wet-ETEM) for In Situ Studies of Liquid-Catalyst Reactions on the Nanoscale*. Microsc. Microanal., 2002. **08**(01): p. 21-28.
169. Oleshko, V.P., et al., *In situ real-time environmental TEM of gas phase Ziegler–Natta catalytic polymerization of propylene*. J. Electron Microsc., 2002(51): p. 27-39.
170. Ryhänen, J., et al., *Bone healing and mineralization, implant corrosion, and trace metals after nickel-titanium shape memory metal intramedullary fixation*. J. Biomed. Mater. Res., 1999. **47**: p. 472-480.
171. Sun, J.S., et al., *The influence of hydroxyapatite particles on osteoclast cell activities*. J. Biomed. Mater. Res., 1999. **45**: p. 311-321.
172. Hemmerle, J., A. Oncag, and S. Erturk, *Ultrastructural features of the bone response to plasma-sprayed hydroxyapatite coating in sheep*. J. Biomed. Mater. Res., 1997. **36**: p. 418-425.
173. Habibovic, P., et al., *Biomimetic hydroxyapatite coating on metal implants*. J. Am. Ceram. Soc., 2002. **85**: p. 517-522.
174. Balani, K., et al., *Plasma-sprayed carbon nanotube reinforced hydroxyapatite coatings and their interaction with human osteoblasts in vitro*. Biomaterials, 2007. **28**: p. 618-624.
175. Chen, F., et al., *Biocompatibility of electrophoretical deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on roughen titanium surface: In vitro evaluation using mesenchymal stem cells*. J. Biomed. Mater. Res., 2007. **82B**: p. 183-191.
176. Hu, R., C.J. Lin, and H.Y. Shi, *A novel ordered nano hydroxyapatite coating electrochemically deposited on titanium substrate*. J. Biomed. Mater. Res., 2007. **80A**: p. 687-692.
177. Filip, P., A.C. Kneissl, and K. Mazanov, *Physics of hydroxyapatite plasma coatings on TiNi shape memory materials*. Mat. Sci. Eng., 1997. **A234-236**: p. 422-425.
178. Sun, L., et al., *Surface characteristics and dissolution behavior of plasma-sprayed hydroxyapatite coating*. J. Biomed. Mater. Res., 2002. **62**: p. 228-236.
179. Lagoa, A.L.C., et al., *A strut graft substitute consisting of a metal core and a polymer surface*. J. Mater. Sci. Mater. Med., 2008. **19**: p. 417-424.
180. Lynn, A.K. and D.L. DuQuesnay, *Hydroxyapatite-coated Ti-6Al-4V. Part 1: the effect of coating thickness on mechanical fatigue behaviour*. Biomaterials, 2002. **23**: p. 1937-1946.

181. Prymak, O., et al., *NiTi shape memory alloys coated with calcium phosphate by plasma-spraying. Chemical and biological properties*. Mat.-wiss. u. Werkstofftech., 2004. **35**: p. 346-351.
182. Yang, Y.Z. and J.L. Ong, *Bond strength, compositional, and structural properties of hydroxyapatite coating on Ti, ZrO₂-coated Ti, and TPS-coated Ti substrate*. J. Biomed. Mater. Res., 2003. **64A**: p. 509-516.
183. Andersson, A.S., et al., *Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 3427-3436.
184. Bretagnol, F., et al., *Direct fabrication of nanoscale bio-adhesive patterns by electron beam surface modification of plasma polymerized poly ethylene oxide-like coatings*. Nanotechnology, 2008. **19**.
185. Choudhary, S., et al., *Increased endothelial and vascular smooth muscle cell adhesion on nanostructured titanium and CoCrMo*. Int. J. Nanomedicine, 2006. **1**: p. 41-49.
186. Lim, J.Y. and H.J. Donahue, *Cell sensing and response to micro- and nanostructured surfaces produced by chemical and topographic patterning*. Tissue Eng., 2007. **13**: p. 1879-1891.
187. Lu, J., et al., *Improved endothelial cell adhesion and proliferation on patterned titanium surfaces with rationally designed, micrometer to nanometer features*. Acta Biomater., 2008. **4**: p. 192-201.
188. Palin, E., H.N. Liu, and T.J. Webster, *Mimicking the nanofeatures of bone increases bone-forming cell adhesion and proliferation*. Nanotechnology, 2005. **16**: p. 1828-1835.
189. Brunette, D.M. and B. Chehroudi, J. Biomech. Eng., 1999. **121**: p. 49-57.
190. Balgar, T., et al., *Preparation of submicron-structured alkylsiloxane monolayers using prepatterned silicon substrates by laser direct writing*. Langmuir, 2004. **20**: p. 3525-3527.
191. Balgar, T., et al., Appl. Phys. A, 2006. **82**: p. 15-18.
192. Bram, M., et al., *Herstellung von hochporösen, endkonturnahen Titan-Formkörpern für biomedizinische Anwendungen*. Mat.-wiss. u. Werkstofftech., 2004. **35**: p. 213-218.
193. Assad, M., et al., *Porous titanium-nickel for intervertebral fusion in a sheep model: Part 2. Surface analysis and nickel release assessment*. J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater., 2003. **64B**: p. 121-129.
194. Assad, M., et al., *Porous titanium-nickel for intervertebral fusion in a sheep model: Part 1. Histomorphometric and radiological analysis*. J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater., 2003. **64B**: p. 107-120.
195. Vehof, J.W.M., et al., *Bone formation in CaP-coated and noncoated titanium fiber mesh*. J. Biomed. Mater. Res., 2003. **64A**: p. 417-426.

196. Wen, H.B., et al., *Preparation of bioactive microporous titanium surface by a new two-step chemical treatment*. J. Mater. Sci. Mater. Med., 1998. **9**: p. 121-128.
197. Yang, Y.Z., et al., *Preparation of graded porous titanium coatings on titanium implant materials by plasma spraying*. J. Biomed. Mater. Res., 2000. **52**: p. 333-337.
198. Liao, H., et al., *Response of rat osteoblast-like cells to microstructured model surfaces in vitro*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 649-654.
199. Soumetz, F.C., L. Pastorino, and C. Ruggiero, *Human osteoblast-like cells response to nanofunctionalized surfaces for tissue engineering*. J. Biomed. Mater. Res., 2008. **84B**: p. 249-255.
200. Rebollar, E., et al., *Proliferation of aligned mammalian cells on laser-nanostructured polystyrene*. Biomaterials, 2008. **29**: p. 1796-1806.
201. Misra, S.K., et al., *Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P(3HB)/Bioglass (R) composites*. Biomaterials, 2008. **29**: p. 1750-1761.
202. Wiemann, M., et al., *Oriented Growth of Osteoblast-like Cells on Two-Dimensionally Structured Films of Functionalized Calcium Phosphate Nanoparticles on a Silicon Substrate*. Adv. Eng. Mater., 2007. **12**: p. 1077-1081.
203. Smith, L.L., et al., *Decreased fibroblast and increased osteoblast adhesion on nanostructured NaOH-etched PLGA scaffolds*. Int. J. Nanomedicine, 2007. **2**: p. 383-388.
204. Simon, K.A., et al., *Enhancing cell adhesion and confinement by gradient nanotopography*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**: p. 4892.
205. Pezzatini, S., et al., *Nanostructured HA crystals up-regulate FGF-2 expression and activity in microvascular endothelium promoting angiogenesis*. Bone, 2007. **41**(4): p. 523-534.
206. Sharkeev, Y.P., et al., *Nanostructured titanium for medicine*. Phisicheskaja mezomechanika (in russian), 2004. **7**: p. 107-110.
207. Bajaj, P., et al., *Ultrananocrystalline diamond film as an optimal cell interface for biomedical applications*. Biomed. Microdevices, 2007. **9**: p. 787-794.
208. Weast, R.C., ed. *The CRC handbook of chemistry and physics*. Vol. 66th Ed. 1985-86, CRC Press: Boca Raton, Florida.
209. Grojo, D., et al., *The so-called dry laser cleaning governed by humidity at the nanometer scale*. Appl. Phys. Lett., 2008. **92**.
210. Rode, A.V., et al., *Ultrafast laser ablation for restoration of heritage objects*. Appl. Surf. Sci., 2008. **254**: p. 3137-3146.

211. Scandella, L., et al., *Alignment of single-crystal zeolites by means of microstructured surfaces*. Adv. Mater., 1996. **8**: p. 137-139.
212. Matsuzawa, M., et al., *Langmuir*, 1998. **14**: p. 5133-5138.
213. Choi, J., et al., *Calcium phosphate coating on nickel-titanium shape memory alloys. Coating procedure and adherence of leukocytes and platelets*. Biomaterials, 2003. **24**: p. 3689-3696.
214. Cai, K., J. Bossert, and K.D. Jandt, *Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation?* Coll. Surf. B: Biointerfaces, 2006. **49**: p. 136-144.
215. Schneider, G.B., et al., *Differentiation of preosteoblasts is affected by implant surface microtopographies*. J. Biomed. Mater. Res., 2004. **69A**: p. 462-468.
216. Trentz, O.A., et al., *Testung von Knochenimplantaten auf Zelllinien und humanen Osteoblasten*. Unfallchirurg, 1997. **100**: p. 39-43.
217. Wang, J.H.C., et al., *Alignment and proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts in microgrooved silicone substrata subjected to cyclic stretching*. J. Biomechanics, 2000. **33**: p. 729-735.
218. Wiemann, M., et al., *The binding of rhBMP-2 to the Receptors of viable MC3T3-E1 Cells and the question of cooperativity*. Mater. Wiss. Werkstofftechn., 2001. **32**: p. 931-936.
219. Harris, S.E., et al., *Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts*. J. Bone Miner. Res., 1994. **9**: p. 855-863.
220. Hamilton, D.W., B. Chehroudi, and D.M. Brunette, *Comparative response of epithelial cells and osteoblasts to microfabricated tapered pit topographies in vitro and in vivo*. Biomaterials, 2007. **28**: p. 2281-2293.
221. Sokolova, V., et al., *Functionalisation of calcium phosphate nanoparticles by oligonucleotides and their application to gene silencing*. J. Mater. Chem., 2007. **17**: p. 721-727.
222. Sokolova, V., et al., *Tracking the pathway of calcium phosphate/DNA nanoparticles during cell transfection by incorporation of red-fluorescing tetramethylrhodamine isothiocyanate-bovine serum albumin into these nanoparticles*. J. Biol. Inorg. Chem., 2007. **12**: p. 174-179.
223. Zhang, T.Z., et al., *Cellular effect of high doses of silica-coated quantum dot profiled with high throughput gene expression analysis and high content cellomics measurements*. Nano Lett., 2006. **6**: p. 800-808.
224. Xu, Z.P., et al., *Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery*. Chem. Eng. Sci., 2006. **61**: p. 1027-040.

225. Lv, H.T., et al., *Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery*. J. Controlled Release, 2006. **114**: p. 100-109.
226. Gao, J., et al. *Synthesis, characterization and cytotoxicity of FePt@CoS₂ yolk-shell nanocrystals*. in *MRS Fall Meeting*. 2006. Boston.
227. Chen, H.W., et al., *Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice*. FASEB J., 2006. **13**: p. 2393-2395.
228. Aryal, B.P., et al., *Metallothioneins initiate semiconducting nanoparticle cellular toxicity*. Small, 2006. **2**: p. 1159-1163.
229. Kirchner, C., et al., *Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles*. Nano Lett., 2005. **5**: p. 331-338.
230. Jia, G., et al., *Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene*. Environ. Sci. Technol., 2005. **39**: p. 1378-1383.
231. Jessel, N., et al., *Multiple and time-scheduled in situ DNA delivery mediated by beta-cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2006. **103**: p. 8618-8621.
232. Puthenveedu, M.A., G.A. Yudowski, and M. von Zastrow, *Endocytosis of neurotransmitter receptors: location matters*. Cell, 2007. **130**: p. 988-989.
233. Marco, E., et al., *Endocytosis optimizes the dynamic localization of membrane proteins that regulate cortical polarity*. Cell, 2007. **129**: p. 411-422.
234. Futterer, K. and L.M. Machesky, *"Wunder" F-BAR domains: Going from pits to vesicles*. Cell, 2007. **129**: p. 655-657.
235. Polo, S. and P.P. Di Fiore, *Endocytosis conducts the cell signaling orchestra*. Cell, 2006. **124**: p. 897-900.
236. Marsh, M. and A. Helenius, *Virus entry: Open sesame*. Cell, 2006. **124**: p. 729-740.
237. Haucke, V., *Cargo takes control of endocytosis*. Cell, 2006. **127**: p. 35-37.
238. Swihart, J.C., et al., *Atomic force microscopy of the erythrocyte membrane skeleton*. J. Microsc., 2001. **204**: p. 212-225.
239. Wolff, J.A. and V. Budker, *The mechanism of naked DNA uptake and expression*. Adv. Genet., 2005. **54**: p. 3-20.
240. Yoshino, H., K. Hashizume, and E. Kobayashi, *Naked plasmid DNA transfer to the porcine liver using rapid injection with large volume*. Gene Ther., 2006. **13**: p. 1696-1702.
241. Srinivasan, C., et al., *Labeling and intracellular tracking of functionally active plasmid DNA with semiconductor quantum dots*. Mol. Ther., 2006. **14**: p. 192-201.
242. Iida, Y., et al., *Transthoracic direct current shock facilitates intramyocardial transfection of naked plasmid DNA infused via coronary vessels in canines*. Gene Ther., 2006. **13**: p. 906-916.

243. Lechardeur, D., A.S. Verkman, and G.L. Lukacs, *Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer*. Adv. Drug Deliv. Rev., 2005. **57**: p. 755-767.
244. Lechardeur, D., et al., *Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer*. Gene Ther., 1999. **6**: p. 482-497.
245. Kawabata, K., Y. Takakura, and M. Hashida, *The fate of plasmid DNA after intravenous injection in mice: involvement of scavenger receptors in its hepatic uptake*. Pharm. Res., 1995. **12**: p. 825-830.
246. Liu, T., et al., *Calcium phosphate nanoparticles as a novel nonviral vector for efficient transfection of DNA in cancer gene therapy*. Cancer Biother. Radiopharm., 2005. **20**: p. 141-149.
247. Sandhu, A.P., et al., *Calcium enhances the transfection potency of stabilized plasmid-lipid particles*. Anal. Biochem., 2005. **341**: p. 156-164.
248. Köller, M., et al., *Arachidonic acid induces DNA-fragmentation in human polymorphonuclear neutrophil granulocytes*. Inflammation, 1997. **21**: p. 463-474.
249. Corry, D. and J. Moran, *Assessment of acrylic bone cement as a local delivery vehicle for the application of non-steroidal anti-inflammatory drugs*. Biomaterials, 1998. **19**: p. 1295-1301.
250. Wataha, J.C., et al., *Relating nickel-induced tissue inflammation to nickel release in vivo*. J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater., 2001. **58**: p. 537-544.
251. Benkirane-Jessel, N., et al., *Control of monocyte morphology on and response to model surfaces for implants equipped with anti-inflammatory agents*. Adv. Mater., 2004. **16**: p. 1507.
252. Schuster, M.J., et al., *Multicomponent DNA carrier with a vesicular stomatitis virus Gpeptide greatly enhances liver-targeted gene expression in mice*. Bioconjug. Chem., 1999. **10**: p. 1075-1083.
253. Luo, D. and W.M. Saltzman, *Synthetic DNA delivery systems*. Nature Biotechnol., 2000. **18**: p. 33-37.
254. Sokolova, V., et al., *Synthesis and characterisation of DNA-functionalised calcium phosphate nanoparticles*. Mat.-wiss. u. Werkstofftech., 2006. **37**: p. 441-445.
255. Okada, E. and H. Urushibata. *Deinking of toner printed paper*. in 1991 TAPPI Pulping Conference Proceedings. 1991.
256. Liapis, A.I., M.J. Pikal, and R. Bruttini, *Research and development needs and opportunities in freeze drying*. Drying Technology, 1996. **14**: p. 1265-1300.
257. Danilova, S.A., *The technologies for genetic transformation of cereals*. Russ. J. Plant Physiol. , 2007. **54**: p. 569-581.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACP	Amorphes Calciumphosphat
Amp	Ampicillin
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
CAP	Carbonat-Apatit
CPD	<i>critical point drying</i>
DCPD	Dicalciumphosphat-Dihydrat
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DSC	<i>differential scanning calorimetry</i>
E. coli	Escherichia coli
EDX	Energiedispersive Röntgenspektroskopie
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EPD	<i>electrophoretic deposition</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FD	<i>freeze-drying</i>
G	Guanin
HAP	Hydroxylapatit
HBS	<i>Hanks buffered saline solution</i>
HEPES	4-2-Hydroxyethyl-1-Piperazineethanesulfonsäure
HIV	<i>human immune deficiency virus</i>
HRTEM	<i>high resolution transmission electron microscopy</i>
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
IR	Infrarot
kDa	Kilodalton
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	Massenspektroskopie
Nano-HAP	Nanopartikulärer Hydroxylapatit
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAH	Polyallylaminhydrochlorid
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
PSS	Polystyrensulfonsäure
PVP	Polyvinylpyrrolidon
REM	Raster-Elektronenmikroskop

RNA	<i>ribonucleic acid</i>
TCP	Tricalciumphosphat
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TG	Thermogravimetrie
UV	Ultraviolett
XRD	Röntgen-Pulverdiffraktomie

7.2 Gefahrstoffe und Entsorgung

Chemikalie	Hersteller	Gefahrstoffsymbol	R-Sätze	S-Sätze	Entsorgung
Aceton	Fluka	F, X _i	11-36-66-67	9-16-26	E2
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Merck	-	-	-	E3
NH ₃ 25 %	Merck	C, N			E2
Ca(C ₃ H ₅ O ₃) ₂ x 5 H ₂ O	Fluka	-	-	-	E3
PEI 10 kD	Aldrich	-	-	-	E2
Ethanol	Merck	F	11	7-16	E2
2-Propanol		F, X _i	11-36-67	7-16-24/25-26	E2
KOH	Merck	C	22-35	26-36/37/39-45	E3
PEI 750 kD	Aldrich	-	-	-	E2
PVP	Fluka	-	-	.	E3

Tabelle 8: Gefahrstoffe und Entsorgung

Entsorgungsschlüssel:

E1: Sammelbehälter für Spül und Waschwasser

E2: Sammelbehälter für organische Lösemittel

E3: Neutralisiert dem Abwasser zugeführt

7.3 Danksagungen

Ich danke

meinem Doktorvater, Prof. Dr. Matthias Epple, für die Überlassung dieses interessanten und reichhaltigen Themas, den bei der Arbeit gewährten Freiraum, die Bereitschaft zu ständiger Diskussion und die Ermöglichung meiner Forschungsaufenthalte in Lissabon und Madrid,

Prof. Dr. Reinhard Zellner für die Übernahme des Koreferats,

Meinen Kooperationspartnern Prof. Dr. E. Hasselbrink, Dr. N. Hartmann und Dr. S. Franzka am Institut für Physikalische Chemie für die Laserstrukturierungen; Prof. Dr. D. Bingmann und Dr. M. Wiemann am Institut für Physiologie für die Zelleexperimente auf den strukturierten Substraten; Dr. H. Schiefer für die Herstellung der porösen Titansubstrate am Forschungszentrum Jülich; Prof. Dr. R. Heumann für die Möglichkeit die Transfektionen an seinem Institut an der Ruhr-Universität Bochum durchzuführen und Prof. Dr. M. Köller für die Unterstützung bei den FACS-Experimente an seinem Institut an der Ruhr-Universität Bochum,

Prof. Dr. M. da Piedade und seiner Arbeitsgruppe an der Universität Lissabon für die herzliche Aufnahme dort und seine Unterstützung,

Prof. Dr. M. Vallet-Regi mit ihrer Arbeitsgruppe an der Universität Madrid für die freundliche Durchführung aller HRTEM-Aufnahmen,

Dr. Wolfgang Meyer-Zaika für die vielen interessanten Diskussionen,

Dr. Frank Neues für die gemeinsame Zeit am Hasylab,

Dr. Rainer Weiß für die vielen Fachgespräche,

Dr. Markus Neumann für die Durchsicht so manchen Textes,

Dipl.-Chem. Stefanie Kittler für die Mitgestaltung des Aufenthalts in Madrid,

Dipl.-Biol. Anna Kovtun für die Durchführung der Zellexperimente,

Dipl.-Min. Holger Nebel für den allmorgendlichen Motivationsschub,

Dipl.-Chem. Paulina Kaempfe, Manuel Neumeier und Dirk Mahl für die Durchsicht dieser Arbeit,

Dipl.-Chem. Janine Schwiertz für die produktive Zusammenarbeit während unseres gemeinsamen Aufenthalts in Lissabon, sowie für die tägliche Mitgestaltung unseres Alltags im Labor,

Cand.-Chem. Matthias Matthes für die Hilfe in Farb- und Stilfragen,

Dipl.-Ing. Smail Boukercha für die Einweisung in die Raster-Elektronen-Mikroskopie,

meiner Auszubildenden Linn Dreyer für die großartige Hilfe bei den Kolloidsynthesen,

den technischen Angestellten des Arbeitskreises für die vielen kleinen Dinge, die ebenfalls nötig sind,

meiner Rollenspielgruppe des Arbeitskreises: Mögen Aventuriens Länder euch noch viele spannende Abenteuer bereit halten und Borons Hallen lange auf euch warten müssen.

Meiner Frau Virginia, die mir in all den Jahren immer zur Seite stand und ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum:	25. Mai 1979
Geburtsort:	Wesel, NRW
Familienstand:	verheiratet, 1 Sohn
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Berufserfahrung

September 2005 – bis Juni 2008	Promotion Universität Duisburg- Essen mit dem Thema: „Calciumphosphat-Nanopartikel als Basis für eine transfizierende Implantatbeschichtung“
--------------------------------	--

Auslandsaufenthalte

Oktober 2006, Mai 2007:	Forschungsaufenthalt Universität Lissabon Arbeitskreis Prof. Dr. M. da Piedade (DAAD Austausch)
Oktober 2007:	Forschungsaufenthalt Universität Madrid Arbeitskreis Prof. Dr. M. Vallet-Regi (DAAD Austausch)

Fachkenntnisse

Keramische, anorganische Nanopartikel, Biomaterialien	
Anorganische Synthese	
Analytische Methoden	REM, HRTEM, FT-IR, TG-IR, DSC, DTA, XRD, EDX, NMR, DLS,

Studium

1999:	Beginn des Chemiestudiums an der Universität Essen
2002:	Vordiplom,
Jan 2005 bis Juni 2005:	Anfertigung der Diplomarbeit im Lehrstuhl für Anorganische Chemie bei Prof. Dr. M. Eppe,
Juni 2005:	Abschluss als Diplom-Chemiker,

Weiterer Bildungsweg

1989 – 1998	Mariengymnasium Bocholt, Erwerb der Hochschulreife,
1985 – 1989	St. Josef- Grundschule Bocholt

7.5 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich bisher keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Essen 27.06.2008

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Vorträge/ Publikationen/ Patente

A) Reguläre Publikationen in referierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften

H. Urch, S. Franzka, D. Dahlhaus, N. Hartmann, E. Hasselbrink, M. Eppe, "Preparation of two-dimensionally patterned layers of functionalised calcium phosphate nanoparticles by laser direct writing", *Journal of Materials Chemistry* **16** (2006) 1798-1802.

H. Urch, C. Geismann, M. Ulbricht, M. **Eppe**, "Deposition of functionalized calcium phosphate nanoparticles on functionalized polymer surfaces", *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik* **37** (2006) 422-425.

M. Wiemann, D. Bingmann, S. Franzka, N. Hartmann, H. Urch, M. Eppe, "Oriented growth of osteoblast-like cells on two-dimensionally structured films of functionalized calcium phosphate nanoparticles on a silicon substrate", *Advanced Engineering Materials* **9** (2007) 1077-1081.

H. Urch, M. Vallet-Regi, L. Ruiz, J. M. Gonzalez-Calbet, M. Eppe, "Calcium phosphate nanoparticles with adjustable dispersability and crystallinity", *Journal of Materials Chemistry* (submitted)

B) Sonstige Publikationen, Kurzbeiträge, zitierfähige Konferenzabstracts (*other publications*) :

H. Urch, M. Ulbricht, C. Geismann, M. Eppe, "Funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel auf Metall- und Polymer-Oberflächen", *Biomaterialien* **6** (2005) 208.

H. Urch, S. Franzka, B. Klingebiel, N. Hartmann, E. Hasselbrink, M. Wiemann, D. Bingmann, M. Eppe, "Alignment of cells on laterally structured layers of calcium phosphate nanoparticles", *Biomaterialien* **7** (2006) 237.

D) Wissenschaftliche Vorträge (*scientific lectures*, P=poster, V=lecture) :

XVIIIth Aachen Colloquium on Biomaterials, Aachen, 15.-16.03.2005, T. Welzel, H. Urch, M. Eppe, "Nanocrystalline calcium phosphates as solid implants and as coating on metal surfaces" (P)

8th International Symposium Biomaterials and Biomechanics: Fundamentals and Clinical Applications, 21.-23.09.2005, Essen, H. Urch, M. Ulbricht, C. Geismann, M. Eppe, "Functionalized calciumphosphate nanoparticles on metal and polymer surfaces" (P)

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Würzburg, 07.-08.10.2005, H. Urch, M. Ulbricht, C. Geismann, M. Eppe, "Funktionalisierte Calciumphosphat-Nanopartikel auf Metall- und Polymer-Oberflächen" (V)

BioNanoMat, Marl, 23.11.-25.11.2005, H. Urch, M. Eppe, "Functionalized calcium phosphate nanoparticles on metal surfaces" (P)

Biomaterials 2006. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Essen, 05.-08.09.2006, H. Urch, S. Franzka, D. Dahlhaus, N. Hartmann, E. Hasselbrink, M. Wiemann, D. Bingmann, M. Eppe, "Preparation of two-dimensionally patterned layers of functionalised calcium phosphate nanoparticles by laser direct writing" (P)

Biomaterials 2006. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien e.V. (DGBM), Essen, 05.-08.09.2006, H. Urch, S. Franzka, B. Klingebiel, N. Hartmann, E. Hasselbrink, M. Wiemann, D. Bingmann, M. Eppe, "Alignment of cells on laterally structured layers of calcium phosphate nanoparticles" (P)

13. Heiligenstädter Kolloquium "Technische Systeme für Biotechnologie und Umwelt", Heiligenstadt, 25.-27.09.2006, H. Urch, S. Franzka, D. Dahlhaus, N. Hartmann, E. Hasselbrink, M. Eppe, "Zweidimensionale Strukturen von funktionalisierten Calciumphosphat-Nanopartikeln durch Laserstrukturierung" (P)

DGG-Glasforum, Deutsche Glastechnische Gesellschaft e.V., Offenbach, 18.10.06, H. Urch, J. Schwiertz, M. Epple, "Nichtmetallische anorganische Biowerkstoffe" (**V, invited**)

2006 MRS Fall Meeting, Boston, USA, 27.11.-01.12.2006, H. Urch, S. Franzka, D. Dahlhaus, N. Hartmann, E. Hasselbrink, M. Vallet-Regi, L. Ruiz, J.M. Gonzalez-Calbet, M. Epple, "Two-dimensionally patterned layers of functionalised calcium phosphate nanoparticles by a combination of electrophoresis and laser direct writing" (**V**)

8th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis (Medicta 2007), Palermo (Italy), 25.-29.09.2007, M. Leskiv, A. L. C. Lagoa, H. Urch, J. Schwiertz M. E. Minas da Piedade, M. Epple, "Thermochemical study of the formation of calcium phosphate nanoparticles" (**V**)

10th International Conference on Advanced Materials, IUMRS-ICAM 2007, Bangalore (Indien), 08.-13.10.2007, M. Epple, R. Heumann, H. Urch, A. Kovtun, "Bioactive coatings for the in-situ transfection of cells after implantation" (**V, invited**)

World Biomaterials Congress, Amsterdam, 28.05.-01.06.2008, H. Urch, A. Kovtun, R. Heumann, M. Epple, "Calcium phosphate/DNA nanoparticles can be immobilized on metal surfaces and used for the transfection of cells" (**P**)

The 4th IUPAC-Sponsored International Symposium on Macro- and Supramolecular Architectures and Materials, Düsseldorf, 7.-11.09.2008, M. Zandi, H. Urch, C. Mayer, H. Mirzadeh, "Preparation and Biocompatibility Evaluation of Gelatin/nano-Rod HAp Scaffold Coated with n-HAp Using Mesenchymal Stem Cells" (**P**)

D) Patente (patents)

M. Epple, A. Kovtun, V. Sokolova, H. Urch, Deutsche Patentanmeldung DE 10 2007 048 591.5, "Implantat und Verfahren zu seiner Herstellung" (angemeldet 05.10.07).